

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"**

**Dottorato di Ricerca in Genetica e Medicina
Molecolare**

Tesi Sperimentale di Dottorato

**"Metabolismo intermedio e patogenicità microbica:
studio della regolazione e dell'espressione
differenziale del gene *gdhA*, codificante la L-
glutammato deidrogenasi NADP-specifica, in isolati
clinici di *Neisseria meningitidis*"**

Coordinatore

Prof. Carmelo Bruno Bruni

Candidato

Dott.ssa Roberta Colicchio

Anno

2005

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"**

**Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e
Molecolare "L. Califano"**

**Tesi di Dottorato in Genetica e Medicina Molecolare
XVII Ciclo**

**"Metabolismo intermedio e patogenicità microbica:
studio della regolazione e dell'espressione
differenziale del gene *gdhA*, codificante la L-
glutammato deidrogenasi NADP-specifica, in isolati
clinici di *Neisseria meningitidis*"**

Candidato: Dott.ssa Roberta Colicchio

Docente Guida: Prof.ssa Paola Salvatore

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"**

**Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e
Molecolare "L. Califano"**

Dottorato in Genetica e Medicina Molecolare

Coordinatore del Corso di Dottorato:

Prof. Carmelo Bruno Bruni

Sede Amministrativa:

Università degli Studi di Napoli "Federico II"

Dipartimenti concorrenti:

Biochimica e Biotecnologie Mediche

Collegio dei Docenti

Prof. Carmelo Bruno Bruni: Coordinatore del dottorato
Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare “L. Califano”, Università di Napoli

Prof. Stefano Bonatti
Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli

Prof. Cecilia Bucci
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche ed Ambientali, Università di Lecce

Prof. Maria Stella Carlomagno
Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare “L. Califano”
Università di Napoli

Prof. Roberto Di Lauro
Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare “L. Califano”
Università di Napoli

Prof. Paola Di Natale
Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli

Prof. Pier Paolo Di Nocera
Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare “L. Califano”
Università di Napoli

Prof. Maria Furia
Dipartimento di Genetica, Biologia Generale e Molecolare, Università di Napoli

Prof. Girolama La Mantia
Dipartimento di Genetica, Biologia Generale e Molecolare, Università di Napoli

Prof. Luigi Lania
Dipartimento di Genetica, Biologia Generale e Molecolare, Università di Napoli

Prof. Lucio Nitsch
Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare “L. Califano”
Università di Napoli

Prof. Lucio Pastore
Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli

Prof. John Pulitzer Finali
Dipartimento di Genetica, Biologia Generale e Molecolare, Università di
Napoli

Prof. Tommaso Russo
Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli

Prof. Lucia Sacchetti
Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli

Prof. Francesco Salvatore
Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli

Dott. Guglielmo R.D. Villani
Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli

Dott. Maria Stella Zannini
Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare “L. Califano”
Università di Napoli

Prof. Raffaele Zarrilli
Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare “L. Califano”
Università di Napoli

Prof. Chiara Zurzolo
Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare “L. Califano”
Università di Napoli

INDICE

INTRODUZIONE	pag. 7
<i>Neisseria meningitidis</i> : caratteri generali	pag. 7
Epidemiologia dell'infezione da meningococco	pag. 10
Ciclo infettivo e fattori di patogenicità di <i>Neisseria meningitidis</i>	pag. 13
La regolazione genica dei fattori di patogenicità	pag. 18
<i>Neisseria meningitidis</i> come paradigma della variazione genetica	pag. 23
Geni metabolici implicati nella patogenicità di <i>N. meningitidis</i>	pag. 25
Il metabolismo del carbonio in <i>N. meningitidis</i>	pag. 27
Influenza del lattato sul metabolismo e sulla patogenicità di <i>N. meningitidis</i> e <i>N. gonorrhoeae</i>	pag. 32
 CARATTERISTICHE GENERALI E PROPRIETÀ DELLE GLUTAMMATO DEIDROGENASI	pag. 35
Caratteristiche generali delle glutammato deidrogenasi	pag. 35
Glutammato deidrogenasi nei mammiferi	pag. 36
Glutammato deidrogenasi nei procarioti	pag. 37
Glutammato deidrogenasi in <i>Escherichia coli</i>	pag. 39
Il sistema di regolazione, Ntr, degli enterobatteri	pag. 41
Il ruolo della proteina Nac nel sistema Ntr	pag. 46
Glutammato deidrogenasi in <i>N. meningitidis</i>	pag. 47
 TIPIZZAZIONE DEI CEPPI DI <i>N. meningitidis</i>	pag. 49
 SCOPO DELLA RICERCA	pag. 51
 MATERIALI E METODI	pag. 52
Cepi batterici e condizioni di crescita	pag. 52
Trasformazione dei meningococchi	pag. 53
Estrazione e purificazione del DNA cromosomale da ceppi di <i>N. meningitidis</i>	pag. 53
Procedure di amplificazione mediante reazione a catena della polimerasi (PCR)	pag. 54
Allestimento di sonde radioattive e procedure di sequenziamento del DNA	pag. 55
Analisi del DNA mediante Southern blot	pag. 56

Plasmidi e procedure di clonaggio	pag. 57
Estrazione dell'RNA totale	pag. 57
Analisi dei trascritti mediante Northern blot	pag. 58
Analisi dei trascritti mediante Slot blot	pag. 58
Saggio di Primer extension	pag. 59
Analisi del trascrittoma	pag. 60
Analisi dell'attività di NADP-GDH	pag. 61
Preparazione degli estratti cellulari e purificazione della proteina	pag. 62
Analisi di Gel mobility shift	pag. 63

RISULTATI pag. 64

Espressione differenziale del gene <i>gdhA</i> in isolati clinici di <i>N. meningitidis</i>	pag. 64
Analisi della regione genomica di <i>gdhA</i> in isolati clinici di <i>N. meningitidis</i>	pag. 68
Stabilità dell'mRNA di <i>gdhA</i> e caratterizzazione funzionale della regione promotore	pag. 73
Identificazione di un regolatore trascrizionale dell'espressione di <i>gdhA</i>	pag. 78
Effetto del <i>knock-out</i> di <i>gdhR</i> sulla trascrizione di <i>gdhA</i>	pag. 80
Complementazione di <i>gdhR</i> nel mutante difettivo	pag. 86
Legame dell'attivatore trascrizionale GdhR al promotore di <i>gdhA</i> ed identificazione della molecola effettrice di GdhR	pag. 88

DISCUSSIONE pag. 91

BIBLIOGRAFIA pag. 97

RINGRAZIAMENTI pag. 109

INTRODUZIONE

Neisseria meningitidis: caratteri generali

Le *Neisseriae* sono diplococchi Gram-negativi, di piccole dimensioni (diametro di circa $0.8\mu\text{m}$), immobili ed asporigeni. La morfologia delle singole cellule è vagamente reniforme e generalmente le cellule sono disposte in coppie, in cui i batteri si “guardano” per la parte piano-concava, tanto da assumere il caratteristico aspetto a “chicco di caffè” (Fig. 1).



Figura 1. Fotografia al microscopio a scansione di *Neisseria meningitidis*.

La maggior parte delle specie di *Neisseriae* sono innocui commensali che colonizzano la superficie di diverse mucose, tuttavia vanno annoverate tra loro due specie altamente patogene per l'uomo: *Neisseria meningitidis* (meningococco) e *Neisseria gonorrhoeae* (gonococco).

N. gonorrhoeae infetta primariamente la mucosa urogenitale o anorettale ed è la causa di due malattie a trasmissione sessuale, la gonorrea e la blenorragia. *N. meningitidis* si isola nel cavo orofaringeo dell'uomo, che ne rappresenta l'unico ospite naturale, in circa il 20% di individui sani, assumendo, pertanto, le caratteristiche di batterio commensale del primo tratto

respiratorio (Virji, 1996). Tuttavia, in particolari circostanze acquisisce capacità invasive: può attraversare la barriera mucosale ed entrare nel circolo sanguigno causando setticemia, e successivamente, attraversare la barriera emato-encefalica provocando meningiti fulminanti (Nassif, 1999; van Deuren et al., 2000) (Fig. 2).

Il terreno di elezione per i meningococchi è l'agar-cioccolato o l'agar GC (GonoCoccal agar), le colture batteriche sono cresciute alla temperatura di 37°C in presenza di una atmosfera umidificata con il 5-10% di CO₂. Sono batteri aerobi: risultano positivi alla reazione della ossidasi (o citocromo ossidasi) e, grazie alla presenza della nitrato reductasi, possono effettuare una respirazione anaerobica utilizzando il nitrato come accettore finale di elettroni nella catena respiratoria.

Diversamente dalle altre *Neisseriae*, i meningococchi presentano una capsula polissaccardica e, sulla base delle differenze antigeniche dei polisaccaridi capsulari, vengono suddivisi in almeno 13 sierogruppi. Sebbene i meningococchi capsulati appartenenti a tutti i sierogruppi colonizzano frequentemente il nasofaringe e possono potenzialmente causare la malattia sistemica, più del 99% delle infezioni sono sostenute da ceppi appartenenti ai sierogruppi A, B, C, 29E, W-135 e Y. I sierogruppi sono poi, ulteriormente suddivisi in venti sierotipi (che identificano gli antigeni proteici di PorB), in dieci siero-subtipi (che identificano gli antigeni di PorA), ed in immunotipi in base alle proprietà immunologiche delle proteine della membrana esterna e del lipo-oligosaccaride (Frash et al., 1985).

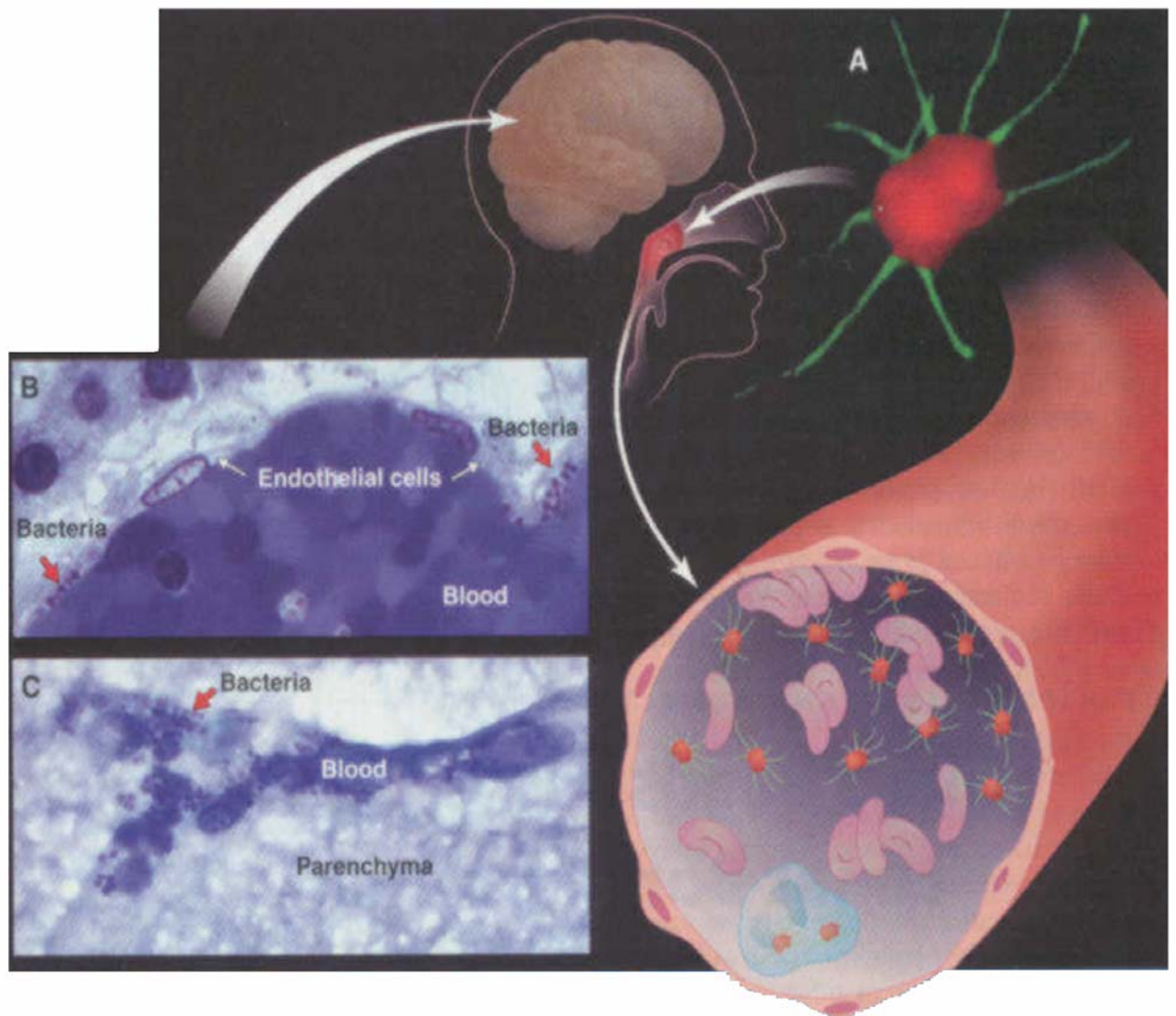


Figura 2. Principali eventi nel processo invasivo di *Neisseria meningitidis*.

Epidemiologia dell'infezione da meningococco

Essendo il nasofaringe umano l'unico *habitat* naturale dei meningococchi, la trasmissione interumana avviene tramite l'inalazione di piccole gocce di secrezioni nasofaringee infette: la principale sorgente di infezione è rappresentata dai portatori, raramente la malattia è trasmessa da un soggetto malato. Ciò nonostante, la prevalenza della malattia meningococcica è solo in parte influenzata dalla quota di portatori, dipendendo l'invasività del batterio dalla suscettibilità e dallo stato immunologico dell'ospite. L'incidenza della malattia meningococcica è più alta nei bambini di età compresa tra i sei mesi ed un anno; un secondo gruppo a rischio è costituito dalla popolazione adolescente di età compresa tra i quattordici ed i venti anni. I neonati, generalmente, sono protetti dalle infezioni da meningococco in quanto hanno in circolo anticorpi materni; nei bambini con età inferiore a cinque anni, invece, l'infezione diventa più comune, poiché in questo periodo della vita gli anticorpi materni diminuiscono in un momento in cui il sistema immunitario non è pienamente maturo (Caugant, 1998). In passato il tasso di letalità superava il 50%, ma con la diagnosi precoce, una corretta terapia, e le opportune misure di sostegno, nella maggior parte dei casi, si ha rapida guarigione senza postumi: il tasso di letalità varia dal 5 al 10% solo se la terapia antibiotica è immediata.

Le infezioni meningococciche possono verificarsi sia come casi sporadici, tra loro epidemiologicamente non correlati, sia in forma di focolai epidemici, talvolta anche estesi. Le epidemie si verificano più frequentemente nelle aree povere della popolazione, dove sono comuni l'affollamento e l'inadeguatezza delle strutture sanitarie.

I meningococchi di sierogruppo A sono la causa principale delle epidemie descritte regolarmente in Sud America, Cina, Nepal, Delhi, Bhutan, Pakistan ed in Africa, soprattutto nella fascia sub-sahariana, che si estende dal Mali all'Etiopia, nota come "cintura della meningite" (Fig. 3). In queste aree del mondo la malattia è costantemente endemica, e le

epidemie si verificano durante la stagione secca, da dicembre a giugno; si stima che oltre il 50-60% dei casi di infezione riguardi bambini di età compresa tra i 3 mesi ed i 5 anni. I ceppi di sierogruppo B e C, invece, predominano più frequentemente nei Paesi industrializzati, Stati Uniti, Europa e Canada, e sono maggiormente associati a casi sporadici di malattia o a epidemie localizzate che possono verificarsi nelle collettività chiuse come scuole, prigioni, caserme, ed ospedali.

Il controllo dell'infezione meningococcica è stato ottenuto mediante vaccinazione, ma il suo impatto, oggi, è ancora limitato. Sono disponibili tre vaccini: un vaccino univalente contro il tipo A, uno univalente contro il tipo C, ed un vaccino quadrivalente contro i tipi A, C, W-135 e Y. Il vaccino viene somministrato per via sottocutanea a partire dai 2 anni di età in quanto è scarsamente efficace nei bambini più piccoli, e la protezione anticorpale compare dopo 7-10 giorni. Negli ultimi anni si è assistito al verificarsi di epidemie di meningite sostenute dal sierogruppo C in diversi Paesi europei (Inghilterra, Galles, Spagna, Ucraina, Olanda, Grecia, Francia e Italia); le più importanti sono state registrate tra la fine degli anni novanta a tutto il 2003, nel novembre del 1999 in Inghilterra sono stati registrati più di 1500 casi ed oltre 200 decessi, tanto che venne intrapreso un intervento di immunizzazione attiva contro il meningococco C a partire già dai 2 mesi di età (Miller, 2002). In contrasto, attualmente, non è disponibile un vaccino efficace per il sierogruppo B, poiché la capsula polisaccaridica di questo sierogruppo è poco immunogena negli adulti e sembra non sia affatto immunogena nei bambini.

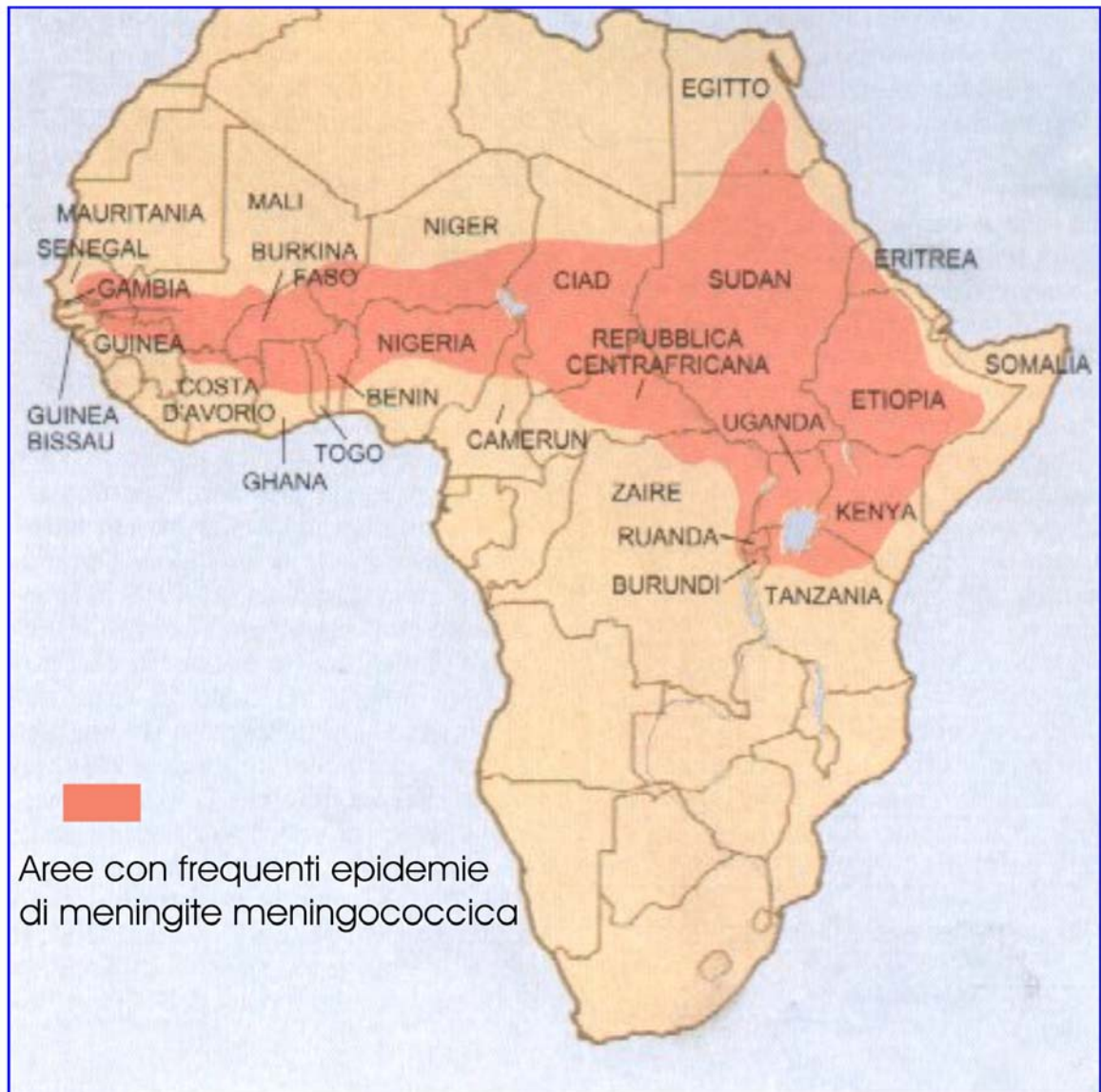


Figura 3. “Cintura della meningite”.

Area geografica africana maggiormente colpita da epidemie causate da ceppi di *Neisseria meningitidis* di sierogruppo A.

Ciclo infettivo e fattori di patogenicità di *N. meningitidis*

Studi epidemiologici hanno consentito di accertare che fattori danneggianti la mucosa del tratto nasofaringeo predispongono l'ospite all'infezione da parte del meningococco. Dall'altra parte, oggi è noto che la virulenza dei meningococchi dipende principalmente dalla capacità del microrganismo di attraversare l'epitelio respiratorio integro, invadere il torrente circolatorio ed attraversare le meningi.

Numerosi studi hanno evidenziato che il ciclo infettivo di *N. meningitidis* coinvolge una serie di interazioni a cascata, mediate da specifici recettori, tra il batterio e la cellula eucariotica bersaglio: in condizioni epidemiche i fattori di patogenicità batterici assumono un ruolo predominante (Halter et al., 1994; Hammerschmidt et al., 1994; Nassif et al., 1994; Nassif, 1999). Determinanti chiave nella virulenza dei meningococchi sono la capsula, i pili, le proteine della membrana esterna, le IgAasi ed il lipo-oligosaccaride. In generale la patogenicità di una specie batterica è legata proprio a determinanti che operano in diversi stadi nel corso dell'infezione.

I pili di tipo IV giocano un ruolo chiave nel nasofaringe, nei primi stadi dell'infezione, essendo responsabili della iniziale adesione "a distanza" tra il batterio e la cellula dell'epitelio mucosale orofaringeo: meningococchi isolati dal nasofaringe, sia di portatori asintomatici, che di pazienti affetti da meningite, mostrano la presenza dei pili (Stephens e McGee, 1981). Numerosi studi hanno, inoltre, evidenziato la loro importanza in qualità di determinanti batterici per stabilire infezioni *in vivo* (Choen et al., 1984; Hook e Holmes, 1985). I pili di tipo IV sono appendici filamentose che si estendono per circa 6µm dalla superficie cellulare (Stephens et al., 1985), le cui subunità elementari (PilE), denominate piline, si aggregano a formare una struttura a simmetria elicoidale che rappresenta l'impalcatura del pilus (Scheuerpflug et al., 1999). Le proteine PilE non sono in grado di interagire direttamente con la cellula ospite, l'adesione è, pertanto, mediata dalla proteina PilC che, associandosi agli

aggregati di pilina all'estremità libera del pilus, conferisce a questo ultimo la specifica capacità di adesione (Nassif et al., 1994). La componente PilC può essere costituita da due proteine, PilC1 e PilC2, entrambe con proprietà adesive, o può essere presente la sola proteina PilC1, componente essenziale per l'adesione pilus-mediata (Nassif et al., 1994). La proteina PilC1 presenta un dominio di legame che probabilmente è implicato nella interazione con un recettore del pilus sito a livello della membrana luminale della cellula epiteliale, identificato nella proteina regolatoria del complemento CD46 (Kallstrom et al., 1997). Mutanti PilC2+/C1- mostrano infatti una ridotta capacità d'invasione le cellule bersaglio (Rahman et al., 1997). È interessante sottolineare che se da un lato le strutture piliali sono necessarie al processo di adesione agli epiteli, dall'altro ne ostacolano la successiva invasione (Nassif et al., 1999).

All'iniziale fase di adesione pilus-mediata segue, pertanto, una seconda fase caratterizzata dalla perdita dei pili e mediata da proteine della membrana esterna del batterio responsabili di un attacco più diretto ed esteso del meningococco alla cellula epiteliale. Tra i determinanti di virulenza della membrana esterna, un ruolo chiave è svolto dalle proteine Opa ed Opc (così chiamate perché responsabili dell'aspetto opaco delle colonie). Queste, interagendo con molecole della famiglia CD66 (le proteine Opa) e con proteoglicani della superficie delle cellule epiteliali (le proteine Opc), rinforzano l'adesione alla cellula epiteliale stabilita dai pili e ne mediano la successiva invasione (Virji et al., 1996; De Vries et al., 1998).

Di recente, nei meningococchi è stato, inoltre, identificato un gene codificante una proteina di 160 kDa denominata App (*adesion and penetration protein*), caratterizzata da un elevato grado di omologia con i membri della famiglia delle proteine autotrasportatrici, in particolare con la proteina Hap (*Haemophilus adesion and penetration*) di *Haemophilus influenzae*, che svolge un ruolo fondamentale nell'interazione con le cellule epiteliali umane (Hadi et al., 2001).

L'interazione delle adesine/invasine del batterio con i relativi recettori della cellula epiteliale stabilisce, così, un “*cross-talk*” tra il meningococco e la cellula bersaglio in seguito al quale i batteri vengono inglobati all'interno di vescicole e traslocati alla membrana basale per essere poi esocitati nello spazio sottomucoso mediante transitosi (Merz e So, 2000; Nassif et al., 1999) (Fig. 4).

In tale stadio del processo infettivo le porine PorA e PorB giocano un ruolo critico. Tali proteine sono in grado di traslocare spontaneamente nella membrana plasmatica della cellula ospite dove funzionano da canali ionici voltaggio-dipendenti determinando una transitoria variazione del potenziale di membrana con conseguente alterazione dei segnali cellulari (Ulmer et al., 1992).

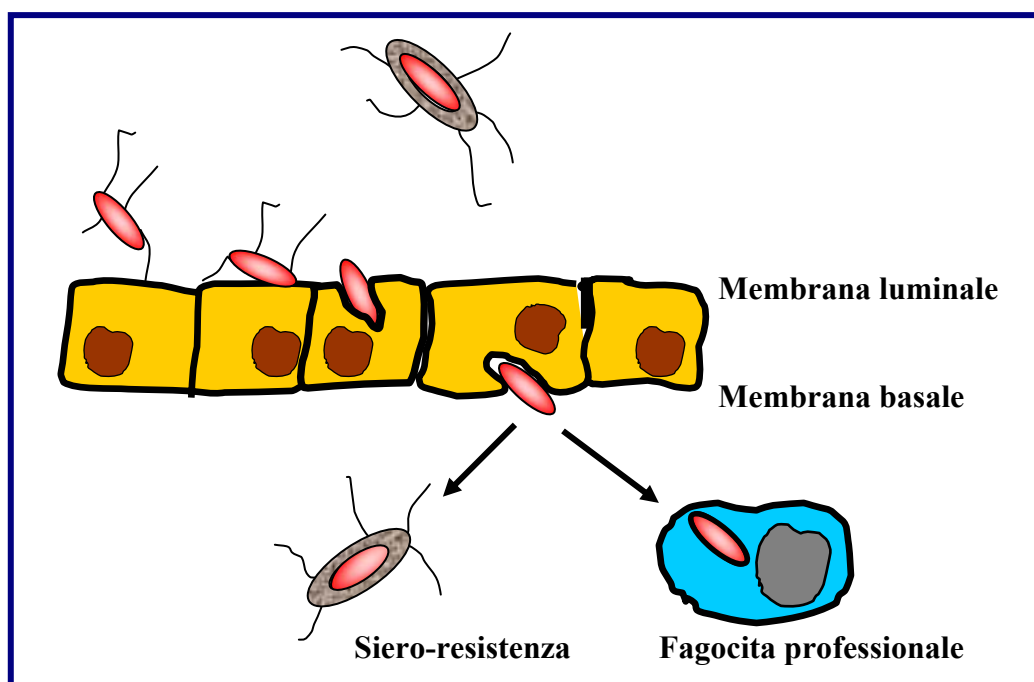


Figura 4. Il ciclo infettivo di *Neisseria meningitidis*.

Sebbene l'esatto ruolo delle porine nel ciclo infettivo di *N. meningitidis* non sia ancora del tutto chiaro, è stato osservato che tali proteine sono capaci di “nucleare” le molecole di actina,

suggerendo, quindi, un loro possibile coinvolgimento nella traslocazione citoplasmatica dei batteri infettanti (Wen et al., 2000).

La colonizzazione della mucosa epiteliale da parte del meningococco può causare una attivazione delle difese immunitarie dell'ospite che si manifesta nella produzione di IgA secretorie, prodotte dalle cellule mucosali del nasofaringe, e nella risposta infiammatoria con reclutamento ed attivazione dei fagociti professionali. L'attacco da parte delle IgA secretorie è, però, neutralizzato mediante la produzione di IgA-proteasi, un altro importante fattore di patogenicità dei meningococchi (Halter et al., 1994), cui recentemente è stata attribuita anche una seconda importante funzione nella patogenesi dell'infezione meningococcica. Numerose sono, infatti, le evidenze che supportano l'ipotesi secondo cui le IgA-proteasi attaccano la principale glicoproteina strutturale di membrana dei lisosomi, LAMP1 (*lysosome-associated membrane protein*), la cui degradazione promuoverebbe la sopravvivenza del batterio all'interno delle cellule epiteliali infettate (Lin et al., 1997; Ayala et al., 1998).

L'esatto ruolo che LAMP1 ricopre nei lisosomi non è ancora del tutto chiaro. E' stato comunque ipotizzato che essa possa avere la funzione di proteggere la membrana lisosomale dalla digestione da parte degli enzimi idrolitici presenti in tale compartimento (Fukuda, 1991; Kornfeld e Mellman, 1989). Se così fosse, la riduzione dei livelli di LAMP1, osservata nelle cellule infettate, avrebbe un effetto negativo sui lisosomi, riducendone stabilità e numero (Ayala et al., 1998).

La glicoproteina LAMP1 è costituita da una breve coda citoplasmatica, da un singolo dominio transmembrana e da due domini luminali fortemente glicosilati, separati da un dominio ricco in prolina IgA1-simile con potenziali siti di taglio per le IgA-proteasi. E' stato osservato che, *in vitro*, l'azione delle IgA-proteasi su LAMP1 è elevata a pH 7.5, intermedia a pH 6.5 e bassa a pH 5.0, suggerendo che tali enzimi siano, di fatto, poco attivi nell'ambiente acido del lume lisosomale (Ayala et al., 1998).

E' interessante, quindi, capire come le IgA-proteasi raggiungano LAMP1 e la degradino, abbassandone il livello nelle cellule infettate. La maggior parte delle glicoproteine LAMP1 neosintetizzate fluisce dall'apparato di Golgi direttamente ai lisosomi; un'altra frazione (5-20%, a seconda del tipo cellulare), invece, dall'apparato di Golgi raggiunge la membrana citoplasmatica per poi essere endocitata ed indirizzata ai lisosomi. Questa frazione di proteine LAMP1 può essere attaccata dalle IgA-proteasi secrete dai batteri aderenti alla superficie cellulare, essendo il dominio ricco in prolina IgA1-simile, esposto sulla faccia esterna della membrana plasmatica, dove è presente un pH ottimale per l'attività di tali enzimi (Ayala et al., 2002; Ayala et al., 1998).

Recentemente è stato identificato un altro possibile percorso attraverso cui LAMP1 diventa accessibile alle IgA-proteasi batteriche. Nelle cellule epiteliali, l'adesione dei pili di tipo IV alla membrana plasmatica, per mezzo dei recettori CD46, determina un rilascio di calcio dai depositi intracellulari. Il conseguente incremento della concentrazione di ioni Ca^{2+} nel citoplasma innesca l'esocitosi dei lisosomi con conseguente rilascio del loro contenuto sulla superficie cellulare ed esposizione di LAMP1 all'attacco delle IgA-proteasi presenti nell'ambiente extracellulare (Kallstrom et al., 1998; Ayala et al., 2001).

Tutti i dati di letteratura, pertanto, indicano che i lisosomi delle cellule ospiti vengono modificati dai meningococchi tanto da favorirne la loro vita intracellulare.

Durante la fase di infezione un altro componente di superficie che gioca un ruolo chiave nel regolare l'ingresso del batterio nella cellula ospite è rappresentato dal lipo-oligosaccaride (LOS). Tale determinante, costituito da una catena oligosaccaridica composta da 5 a 10 unità monosaccaridiche, legate al lipide A mediante l'acido 3-deossi-D-manno-ottulosonico (Pavliak et al., 1993), è altresì responsabile della suscettibilità del batterio all'azione anticorpale e dell'attivazione degli elementi del complemento (van Putten, 1993).

Superata la barriera fisica dell'epitelio, una volta invaso il circolo ematico o il liquido cerebro spinale, il batterio ha la capacità di eludere le difese immunitarie dell'ospite grazie alla

presenza della capsula, che è in grado di mascherare i maggiori determinanti antigenici di superficie. La componente polisialica della capsula determina la resistenza nei confronti della fagocitosi, e previene l'attivazione del complemento tramite la via alternativa. L'acido sialico, inoltre, è un normale costituente delle membrane neurali umane, pertanto viene mantenuto uno stato di immunotolleranza verso tale componente capsulare (Jarvis, 1995; Hammerschmidt et al., 1994).

Recentemente è stato identificato un secondo meccanismo che consente ai meningococchi di guadagnare il circolo ematico, ovvero la sopravvivenza all'interno dei fagociti. Infatti, una volta inglobati dai fagociti professionali, essi risiedono in fagosomi, i quali possono andare incontro alla fusione con i lisosomi dando origine ai fagolisosomi (Weel e van Putten, 1991). Nel fagolisosoma i batteri si trovano in un ambiente estremamente ostile, ricco di meccanismi neutralizzanti ossidativi, cui però i meningococchi abilmente riescono ad opporsi mediante meccanismi che gli consentono di essere potenziali microrganismi intracellulari facoltativi. Tali meccanismi includono l'incremento del consumo di ossigeno (Cohen e Cooney, 1984; Britigan et al., 1988), la produzione di elevati livelli di catalasi (Dunn et al., 2003) ed il passaggio alla crescita anaerobica, con conseguente utilizzo dei nitriti come accettori finali nella catena di trasporto degli elettroni (Hasset e Cohen, 1989).

All'interno dei fagosomi i batteri riescono, pertanto, a sopravvivere in attesa di una lisi citotossica o di un rilascio esocitotico da parte del fagocita nel circolo ematico. Tutto ciò rappresenta un ulteriore adattamento dei meningococchi ai continui ed imprevedibili cambiamenti microambientali cui vanno incontro durante il processo infettivo.

La regolazione genica dei fattori di patogenicità

I fattori di patogenicità vengono espressi in maniera differenziale durante le diverse fasi del complesso ciclo infettivo di *Neisseria meningitidis*: la capacità di invadere l'epitelio è, ad

esempio, ristretta ai meningococchi che mancano di capsula e di pili, ma che esprimono la proteina Opc ed il lipo-oligosaccaride. Tuttavia, le strutture che ostacolano la fase iniziale, risultano poi indispensabili nelle fasi successive, e quelle, che, invece, risultano essenziali inizialmente, diventano in seguito un impedimento: la capsula, che rappresenta un ostacolo nel processo di invasione delle cellule epiteliali (Read et al., 1996), è invece, necessaria per l'invasione del circolo ematico o del liquido cerebro-spinale, in quanto elude il sistema immunitario dell'ospite, mascherando i maggiori determinanti antigenici di superficie.

Per questo motivo le *Neisserie* patogene hanno sviluppato sofisticati meccanismi adattativi per far fronte ai continui cambiamenti microambientali. Tali programmi adattativi vengono attuati mediante due principali strategie: la variazione genetica e la regolazione genica trascrizionale.

N. meningitidis è in grado di rispondere a definiti stimoli ambientali regolando l'espressione di geni associati alla patogenicità batterica. L'analisi del trascrittoma di numerosi isolati clinici di meningococco, ha rivelato la presenza di svariate sequenze geniche differenzialmente o selettivamente espresse tra ceppi patogeni e ceppi commensali.

Tali sistemi di regolazione agiscono a livello trascrizionale ed influenzano il fenotipo di una popolazione nella sua globalità sia in risposta a definiti stimoli ambientali, che in risposta a situazioni di stress, quali l'osmolarità, la temperatura elevata (Meyer et al., 1994), la crescita in aerobiosi/anaerobiosi (Honscholder et al., 1999; Lisseden et al., 2000), e la limitata disponibilità di ferro (Genco e Desai, 1996; Schryvers e Stjilikovic, 1999).

L'espressione dei principali determinanti di patogenicità del meningococco può, inoltre, andare incontro a variazioni dovute a cambiamenti che si verificano direttamente a livello del DNA. La variazione genetica comprende due principali meccanismi: la variazione di fase e la variazione antigenica e si realizza mediante cambiamenti del DNA spontanei e spesso reversibili che generano eterogeneità nell'ambito di una determinata popolazione microbica. La variazione antigenica consiste nella elaborazione di versioni strutturalmente differenti di

determinati componenti di superficie quali i pili di tipo IV, le proteine dell'opacità ed il LOS. Tale strategia adattativa consente al meningococco, da un lato, di eludere la risposta immunitaria dell'ospite nel corso delle varie fasi del ciclo infettivo, dall'altro di selezionare le varianti biologicamente più attive di tali strutture superficiali ottimizzando così l'adesione e l'invasione (Achtman, 1995; Meyer et al., 1994; Seifert, 1996; Robertson e Meyer, 1992).

Nelle strutture piliali il fenomeno interessa la componente strutturale *PilE*, la subunità maggiore del pilus. A livello molecolare, il fenomeno è mediato da eventi di ricombinazione tra loci silenti, *pilS* e il locus di espressione *pilE*, con formazione di nuove combinazioni di geni *pilE* (Seifert, 1996). Gli eventi di ricombinazione sono unidirezionali (conversione genica) ed avvengono a livello di sei brevi regioni chiamate "minicassette", tra le quali sono presenti brevi sequenze altamente conservate. Le minicassette rappresentano forme di deposito codificanti l'informazione che permette l'espressione di diversi antigeni (Meyer et al., 1990). Un motivo ripetuto *Sma/Cla* del DNA, localizzato al 3' terminale di tutti i loci pilinici, è richiesto per una efficiente variazione e rappresenta il bersaglio per il legame sito-specifico di molte proteine (Wainwright et al., 1997).

Per variazione di fase si intende, invece, l'oscillazione reversibile tra stati di espressione alternativi di determinati geni, tale meccanismo altera casualmente l'espressione di oltre trenta componenti di superficie, tra cui la capsula (*SiaD*), i pili (*PilC1*, *PilC2*), le proteine coinvolte nel metabolismo del lipo-oligosaccaride (*LgtA*, *LgtG*), le proteine della membrana esterna come le porine (*PorA*), adesine/invasine (*Opa*, *Opc*), proteine coinvolte nel metabolismo del ferro (*FrpB*) e, probabilmente, altri fattori di virulenza (tossine del tipo RTX, serinaproteasi), oltre che fattori che influenzano gli scambi genetici (Achtman, 1995; Meyer et al., 1994; Saunders et al., 2000). Questo meccanismo consente, ad una piccola frazione della popolazione batterica, di esprimere un fenotipo compatibile con un ciclo infettivo produttivo. Le basi genetiche di questa variazione dipendono dall'evoluzione di segmenti di DNA ripetuti, specialmente tratti omo- e eteropolimerici, all'interno o nelle vicinanze di

regioni codificanti che favoriscono l'insorgenza di mutazioni *frame-shift* ad alta frequenza e reversibili, mediante un meccanismo di scivolamento dello stampo (Bucci et al., 1999; Richardson e Stojiljkovic, 2001). L'instabilità di queste ripetizioni durante la replicazione può causare uno scivolamento della cornice di lettura o alterare la distanza critica tra gli elementi di un promotore, alterando così l'espressione genica (Moxon et al., 1994; Robertson e Meyer, 1992). Il tasso di mutazione nelle ripetizioni omopolimeriche è generalmente alto in tutti i ceppi, tuttavia molti isolati clinici possono essere ipermutanti a livello di questi loci, in parte a causa di difetti genici nel sistema di riparazione degli appaiamenti errati *mismatch repair system* (Bucci et al., 1999; Richardson e Stojiljkovic, 2001). Tale meccanismo regola lo stato di espressione dei geni *pilC1* e *pilC2* che codificano la proteina PilC, la componente strutturale, che associata a PilE, svolge un ruolo di primaria importanza nel processo di adesione agli epiteli (Rudel et al., 1992). In questo caso la variazione di fase è associata a mutazioni reversibili che coinvolgono una regione codificante il peptide segnale, caratterizzata dalla ripetizione di residui di guanina. Inserzioni o delezioni all'interno della ripetizione omopolimerica determinano lo scivolamento della cornice di lettura ed il prematuro arresto della traduzione. I geni *opr* di *N. meningitidis* sono regolati in modo simile dalla presenza di una sequenza ripetuta (CR) di lunghezza variabile che influenza la traduzione dei singoli geni. Tale sequenza è costituita da una ripetizione pentamerica (CTCTT) in numero variabile ed è sita nella regione strutturale 5' terminale dei geni codificanti la porzione idrofobica del peptide segnale. La variazione del numero delle ripetizioni, dovute ad inserzione o delezione, determina lo scivolamento della cornice di lettura ed altera conseguentemente lo stato di espressione del gene (Moxon et al., 1994; Robertson e Meyer, 1992).

Nei meningococchi uno dei più importanti fattori di patogenicità è rappresentato dalla capsula, che maschera le componenti proteiche della membrana esterna, bersaglio della risposta immunitaria, ed è pertanto, responsabile dell'inibizione della fagocitosi anticorpo-

dipendente e della batteriolisi mediata dagli elementi del complemento. Anche la variazione di fase della capsula coinvolge una ripetizione omopolimerica di residui di citosine nella regione 5' tradotta del gene *siaD*, codificante l'enzima polisialil-trasferasi. La variazione del numero delle citosine, causata da delezione o inserzione, determina lo scivolamento della cornice di lettura e l'interruzione prematura della traduzione del gene *siaD* nelle varianti prive di capsula (Lavitola et al., 1999; Hammerschmidt et al., 1996).

Studi condotti sui meccanismi molecolari alla base della variazione genetica hanno, inoltre, dimostrato che essenziali per la variazione antigenica e di fase in questo microrganismo sono: il *pathway* di riparazione per ricombinazione, con particolare coinvolgimento della proteina RecA, ed il *pathway* di ricombinazione RecF-like (Kooimey et al., 1987). In particolare, in passato, è stato investigato il ruolo del *pathway* RecBCD nella variazione genetica dei meningococchi. E' stato, infatti, dimostrato che i ceppi di *N. meningitidis*, di sierogruppo B, derivati dalla linea ipervirulenta ET-37 ed alcuni ceppi filogeneticamente distinti, sono estremamente sensibili alle radiazioni UV ed esibiscono elevate frequenze di variazione antigenica ai loci pilinici, tale fenotipo è associato a lesioni biochimiche a livello del complesso enzimatico multifunzionale RecBCD, che controlla il *pathway* primario per la ricombinazione e la riparazione post-replicativa del DNA in molte specie batteriche. Il fenotipo risultante è conseguente alla presenza di un allele difettivo, *recB*^{ET-37}, non funzionale a causa della presenza di multiple mutazioni missenso in una regione critica per la proteina RecB. In particolare, tre mutazioni riguardano residui amminoacidici che sono conservati durante il corso dell'evoluzione nelle proteine RecB di differenti microrganismi. Tali sostituzioni amminoacidiche determinano la distruzione del dominio elicastico UvrD-like della proteina RecB in isolati clinici di *N. meningitidis* di linea ET-37 (Salvatore et al., 2002).

***Neisseria meningitidis* come paradigma della variazione genetica**

Ad oggi il tratto nasofaringeo dell'uomo rappresenta l'unica nicchia ecologica conosciuta di *N. meningitidis*, e la maggior parte dei pazienti affetti da infezione meningococcica non ha avuto precedenti contatti con soggetti malati, pertanto, i portatori asintomatici sono considerati la principale sorgente di trasmissione di ceppi patogeni. Per tale motivo la comprensione dello stato di portatore e lo studio del doppio stile di vita, commensale-patogeno, del batterio può contribuire significativamente alla conoscenza dell'epidemiologia e della complessa patogenesi delle malattie causate da *N. meningitidis* (Broome, 1986).

A tale scopo sono stati messi a punto efficienti sistemi di marcatura genetica per l'identificazione e la classificazione dei ceppi, attraverso la mobilità elettroforetica dei loro enzimi metabolici e l'analisi delle varianti alleliche ricorrenti in diversi loci. Il *MultiLocus Enzyme Electrophoresis* (Selander et al., 1986) ed il *MultiLocus Sequence Typing* (Maiden et al., 1998; Tzanakaki, et al., 2001) sono sistemi ad alta risoluzione per la caratterizzazione del genoma di tutti gli isolati e per la valutazione delle relazioni genetiche tra i ceppi. L'analisi di numerosi ceppi di meningococco, isolati in diverse parti del mondo, ha rivelato una estesa diversità genetica all'interno della specie. *N. meningitidis* è, pertanto, considerato un paradigma di variazione genetica: esiste, infatti, un continuo flusso di materiale genetico in senso orizzontale che altera l'organizzazione genetica della popolazione, caratterizzata dall'occasionale comparsa di cloni responsabili di epidemie e di esplosioni di infezioni in diversi contesti pandemici. La specie ha una struttura di tipo non clonale, ovvero "panmittica", della popolazione caratterizzata dall'occasionale sovracrescita di cloni responsabili di epidemie o microepidemie (Achtman, 1995). L'elevato grado di panmissia è dovuto a scambi orizzontali di geni, che non sono ristretti ad una specie, ma che avvengono anche tra specie diverse dello stesso genere: tra meningococchi, gonococchi, *N. lactamica* e altre *Neisserie* apatogene (Halter et al., 1989; Feavers et al., 1992; Zhou e Spratt, 1992). Gli

scambi genetici orizzontali, favoriti da elementi ripetuti, sequenze di inserzione e sequenze pseudo trasponibili, possono essere interpretati come un meccanismo adattativo indispensabile per la sopravvivenza di un batterio a ristretto spettro d'ospite. Grazie alla capacità di trasformazione naturale i meningococchi hanno, inoltre, sviluppato sofisticati meccanismi per ottimizzare l'adattamento ai continui cambiamenti delle condizioni ambientali riscontrati nei diversi siti anatomici colonizzati. Occorre ricordare, comunque, che sebbene *N. meningitidis* rappresenti un paradigma di variabilità genetica, la regolazione genica trascrizionale è altrettanto importante nell'economia della regolazione globale (Meyer et al., 1994).

Fondamentali per la variazione genetica che si osserva nei meningococchi, e che rappresenta elemento importante per la virulenza, sono i meccanismi di ricombinazione e riparazione del DNA. Esistono recenti evidenze che i tassi di variazione antigenica e di fase possono essere differenti in isolati clinici di *N. meningitidis* come conseguenza di difetti genetici in tali *pathways*. Studi effettuati in parallelo in altri sistemi, indicano che alleli difettivi dei geni di riparazione e ricombinazione del DNA sono riscontrabili in natura ad alta frequenza nelle popolazioni batteriche (Le Clerc et al., 1996). E' inoltre noto che ceppi di meningococco, per la maggior parte appartenenti a stipiti ipervirulenti, che presentano difetti genetici in tali geni, esibiscono un aumento dei tassi di mutazione spontanea ed un'aumentata frequenza di *switching* dei geni fase-variabili e sono pertanto definiti "ceppi mutatori" (Richardson e Stojiljkovic, 2001; Alexander et al., 2004). Lo studio dei meccanismi dell'ipermutazione è fondamentale poiché gli alleli mutatori, o loro possibili combinazioni, giocano un ruolo importante nell'evoluzione del fenotipo patogeno dei meningococchi, influenzando la mutabilità generale e la frequenza degli scambi genetici (Bucci et al., 1999).

Geni metabolici implicati nella patogenicità di *N. meningitidis*

Il confronto della sequenza genomica del ceppo MC58, di sierogruppo B (ET-5), e del ceppo Z2491, di sierogruppo A (IV-1), così come il confronto della sequenza genica complementare di *Haemophilus influenzae*, un altro patogeno umano responsabile di meningite batterica, ha fornito un'opportunità per definire una comune posizione dei geni, potenzialmente implicati, nella patogenesi di questa infezione (Tettelin et al., 2000; Parkill et al., 2000).

Un fattore di cruciale importanza nella patogenicità di *N. meningitidis*, è la capacità di utilizzare e sintetizzare i nutrienti necessari per la sua sopravvivenza nei diversi microambienti dell'ospite durante il processo infettivo.

Recentemente sono stati identificati ben 73 geni che risultano essenziali per l'infezione sistemica nel modello di infezione del ratto neonato, dei quali circa la metà codificano per enzimi coinvolti nel metabolismo e nel trasporto di nutrienti (Sun et al., 2000). Tali geni sono stati identificati mediante la tecnica STM (*signature-tagged mutagenesis*), applicata con successo anche ad altri patogeni, tra cui *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Mycobacterium tuberculosis* (Hensel et al., 1995; Mei et al., 1997; Chiang et al., 1998; Polissi et al., 1998; Camacho et al., 1999). Tale tecnica consente di "screenare", simultaneamente, *in vivo*, un ampio numero di mutanti, allo scopo di individuare geni essenziali per l'instaurarsi ed il perdurare dei processi infettivi (Shea et al., 2000). Questa è una caratteristica tipica della tecnica STM, che non si ritrova in altre strategie di genomica funzionale sviluppate per lo studio dei patogeni *in vivo*. Le tecniche IVET (*in vivo expression technology*) e DFT (*differential fluorescent technology*), ad esempio, consentono di identificare geni la cui espressione è indotta nell'ospite, ed esperimenti addizionali sono poi richiesti per stabilire se questi geni sono necessari durante la fase di colonizzazione dei tessuti (Mecsas, 2002).

La tecnica STM richiede l'utilizzo di un metodo di mutagenesi inserzionale che permetta l'incorporazione di segnali di identificazione ("etichette") nei geni mutati. Tali segnali di identificazione sono delle sequenze di DNA a doppio filamento, costruite in modo tale da avere una regione centrale (di circa 40 bp) variabile, fiancheggiata da due braccia (di circa 20 bp ciascuna) costanti, utili per le reazioni di amplificazione. Nel modello sperimentale di infezione meningococcica del ratto neonato, ad esempio, sono state costruite 96 differenti "etichette", poste ognuna all'interno di un trasposone, ed utilizzate, poi, per effettuare esperimenti di mutagenesi *in vitro* del DNA di *N. meningitidis*. Il DNA mutagenizzato, così ottenuto, è stato poi utilizzato per trasformare le cellule di meningococco (Fig. 5).

Dall'analisi della sequenza nucleotidica delle regioni fiancheggianti i trasposoni nelle 73 ORF individuate, si è osservato che otto inserzioni erano localizzate in geni codificanti fattori di patogenicità già noti, implicati nella biosintesi del polisaccaride capsulare, del lipooligosaccaride e delle molecole coinvolte nell'*uptake* del ferro.

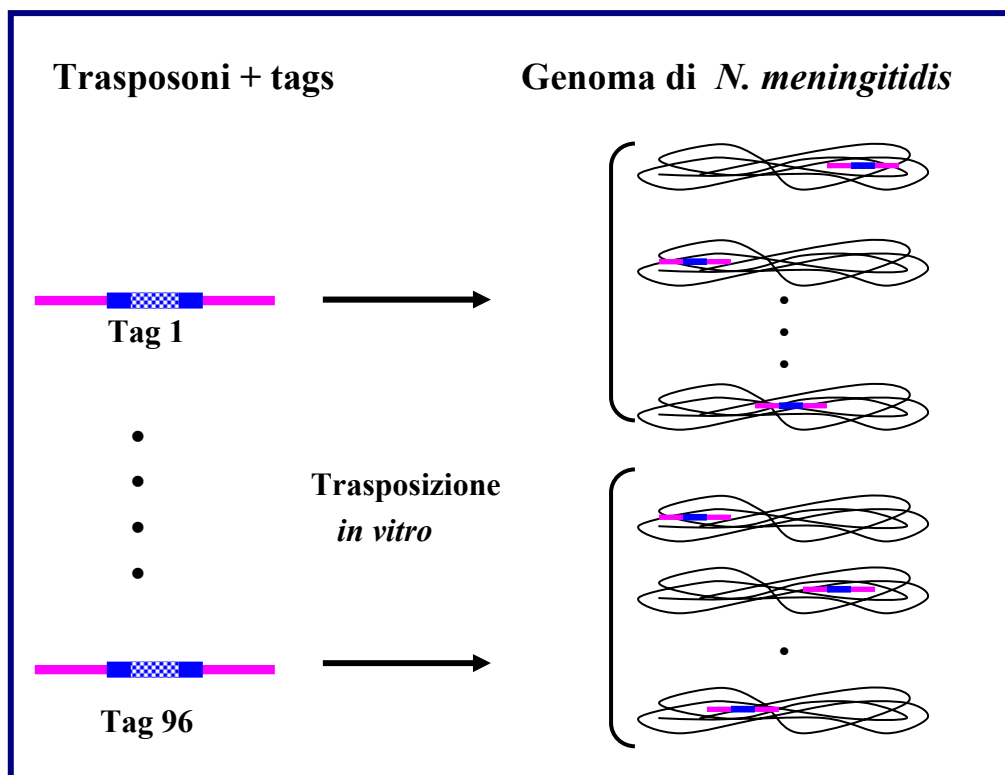


Figura 5. Mutagenesi *in vitro* del genoma di *N. meningitidis*.

L'implicazione dei rimanenti 65 geni nella patogenesi di *N. meningitidis* non era precedentemente nota. La funzione di 16 geni, tra i 73 individuati con tale approccio, rimane ancora sconosciuta, mentre i rimanenti 57 sono stati caratterizzati anche funzionalmente. Circa la metà dei geni coinvolti nella patogenesi meningococcica codifica enzimi implicati nel metabolismo: in particolare, sono stati identificati geni codificanti proteine trasportatrici di nutrienti, tra cui la L-lattato permeasi e proteine trasportatrici del fosforo (*ptsH*), geni implicati nella biosintesi di purine, pirimidine, nucleosidi e nucleotidi (*galU*, *purL*), nella biosintesi di cofattori (*pabB*), nel metabolismo degli acidi grassi e dei fosfolipidi (*dgkA*), nel metabolismo dei carboidrati (*fda*, *grxC*). Undici di questi geni, in particolare, sono coinvolti nella biosintesi degli aminoacidi: cinque (*aroB*, *aroC*, *aroD*, *aroE*, *aroG*) nella via dello scimato, due (*ilvD* e *ilvL*) nella sintesi dell'isoleucina e della valina, due (*metF* e *metH*) nella biosintesi della metionina, uno (*fhs*) nella sintesi del 10-formil-tetraidrofosfato, utilizzato nella sintesi delle purine e nella formazione del tRNA con metionina, ed uno (*gdhA*) nel metabolismo del glutammato (Sun et al., 2000).

La regolazione dell'espressione del gene *gdhA*, codificante l'enzima L-glutammato deidrogenasi NADP-specifico, oggetto del mio studio è, pertanto, considerato un elemento importante per la comprensione della dinamica dei processi infettivi e della virulenza dei meningococchi. Dati di letteratura indicano, inoltre, che topi infettati con ceppi ipervirulenti di *N. meningitidis* *knock-out* per *gdhA* sopravvivono dopo l'infezione, suggerendo uno stretto coinvolgimento tra *gdhA* e patogenicità (Sun et al., 2000).

Il metabolismo del carbonio in *N. meningitidis*

Il meningococco è in grado di utilizzare un ristretto *range* di sorgenti di carbonio quali: il glucosio, il maltosio, il lattato ed il piruvato (Leighton et al., 2001). Il genoma di *N. meningitidis*, codifica tutti gli enzimi coinvolti nella glicolisi ad eccezione della

fosfofruttochinasi, che catalizza la conversione del fruttosio 6-fosfato a fruttosio 1,6-difosfato; per tale motivo, il glucosio non può percorrere la via glicolitica interamente, ed è metabolizzato attraverso la via di Entner-Doudoroff, ed in parte attraverso la via dei pentosi fosfati, i cui *set* completi di enzimi sono stati ritrovati nel genoma di *N. meningitidis* (Holten e Jyssum, 1973; Holten, 1974; Parkhill et al., 2000).

La via dei pentosi fosfati, in particolare, è presente in tutte le cellule, eucariotiche e procariotiche, e rappresenta un percorso alternativo di degradazione del glucosio che porta alla formazione di prodotti fondamentali per il metabolismo cellulare, come il ribosio 5-fosfato, necessario per la biosintesi dei nucleotidi, l'eritrosio 4-fosfato, richiesto nella biosintesi degli aminoacidi aromatici; è inoltre, una importante fonte di potere riducente, sotto forma di NADPH. Entrambi i percorsi (via di Entner-Doudoroff e via dei pentosi fosfati) convertono il glucosio prima a gliceraldeide 3-fosfato, poi a piruvato, così come nella glicolisi (Fig. 6).

Il maltosio è, invece, idrolizzato dalla maltasi con formazione di due molecole di glucosio, mentre il lattato è convertito ad acido piruvico mediante la lattico deidrogenasi FAD-dipendente. L'acido piruvico, a sua volta, mediante il sistema della piruvato deidrogenasi, passa ad acetilCoA, il quale è catabolizzato attraverso la via degli acidi tricarbossilici (TCA).

L'analisi della sequenza genomica completa del ceppo MC58 di *N. meningitidis*, di sierogruppo B, ha confermato la presenza di tutti gli enzimi del ciclo TCA, ad esclusione della malato deidrogenasi NAD-dipendente (ossida il malato ad ossalacetato), sostituita da una malato ossidasi FAD-dipendente legata alla membrana (Holten, 1976; Parkhill et al., 2000).

La malato ossidasi FAD-dipendente è associata alla catena di trasporto degli elettroni, ed ha il compito di trasferire questi ultimi dal malato al FAD, dal quale sono direttamente incanalati nella catena respiratoria.

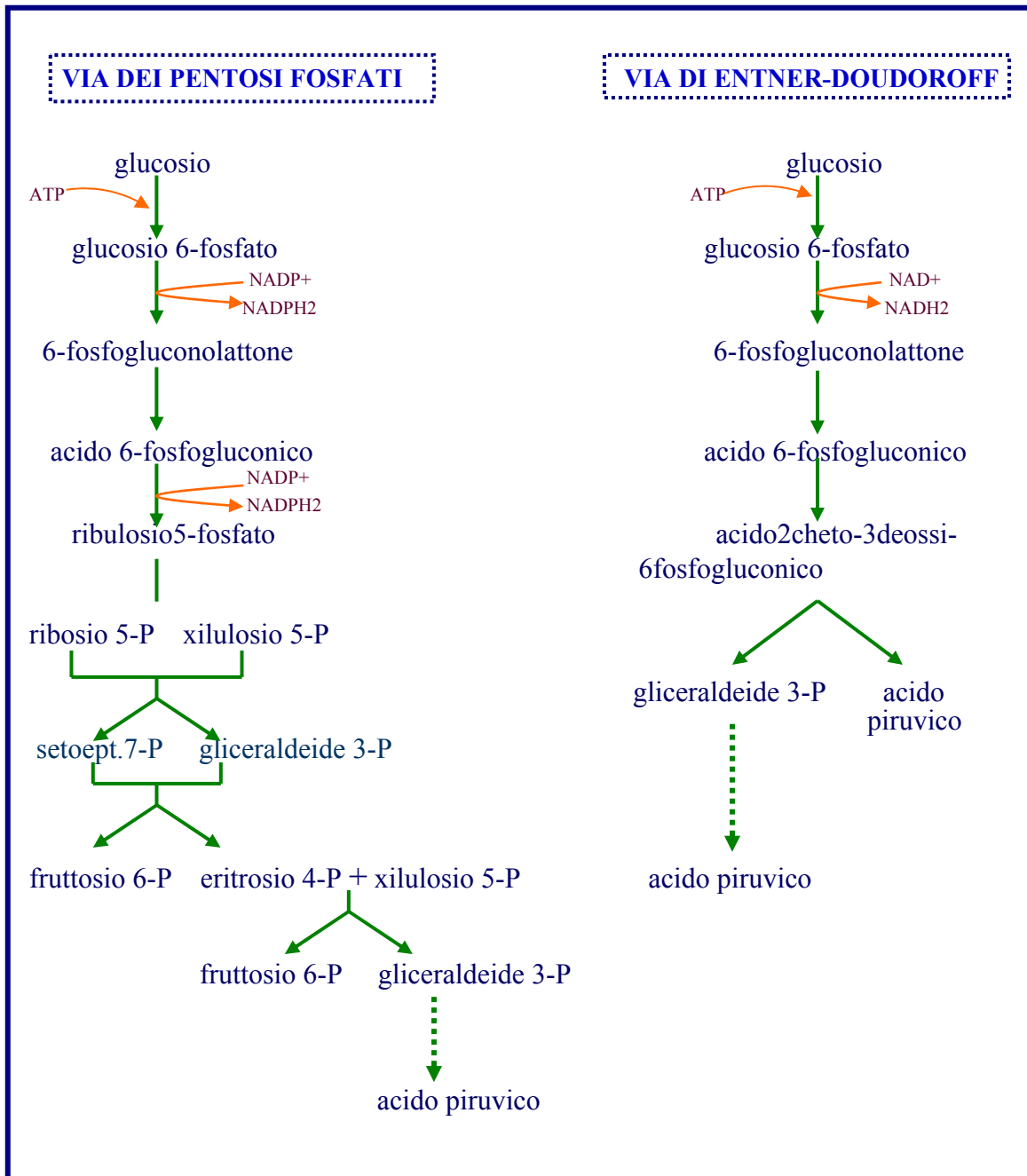


Figura 6. Via dei pentosi fosfati e via di Entner-Doudoroff.

La capacità di crescere sul lattato richiede la presenza dell'enzima lattato deidrogenasi (LDH) che catalizza l'ossidazione del lattato a piruvato. *N. meningitidis* possiede: una LDH NADH-dipendente citoplasmatica, implicata fundamentalmente nella riduzione del piruvato a lattato, e due LDH FAD-dipendenti associate alla membrana, e specifiche una per l'isomero L e

l'altra per l'isomero D del lattato, che catalizzano l'ossidazione del lattato a piruvato (Erwin et al., 1993; 1996).



Gli isomeri del lattato non sono entrambi prodotti dall'uomo: le cellule di mammifero, infatti, producono solo l'isomero L, il quale può comunque essere utilizzato dal meningococco nel torrente circolatorio, nel liquido cerebro-spinale e nel nasofaringe (Erwin et al., 1996). Tuttavia, l'isomero D del lattato può essere prodotto a partire dal glucosio, da alcuni batteri lattici presenti a livello del nasofaringe, iniziale sito di colonizzazione del meningococco.

Le LDH associate alla membrana trasferiscono gli elettroni direttamente dal lattato, attraverso il FAD, alla catena di trasporto degli elettroni a livello del *pool* del chinone. Recentemente è stata dimostrata la presenza in *N. meningitidis* di una seconda L-LDH FAD-dipendente, associata alla membrana, con una probabile differente regolazione rispetto alla prima. In particolare, è stato osservato che l'L-LDH-1 presenta un'attività più alta in batteri cresciuti su piastra, un'attività intermedia in batteri cresciuti in terreno liquido ben aerato, e più bassa in batteri cresciuti in terreno liquido poco aerato. Invece l'L-LDH-2 mostra una attività più alta in batteri cresciuti in mezzo poco aerato. L'attività di questi enzimi potrebbe, quindi, essere differentemente regolata dalla tensione di ossigeno, ma il meccanismo di regolazione non è ancora chiaro (Erwin et al., 1996).

Analisi di risonanza magnetica nucleare (NMR) hanno consentito di dimostrare che il glucosio, il piruvato, ed il lattato, oltre ad essere metabolizzati attraverso la via degli acidi tricarbossilici, possono seguire una via alternativa: la via Pta-Ack (fosfotransacetilasi-acetatochinasi) (Fig.7). Saggi condotti su estratti proteici hanno confermato la presenza in *N.*

meningitidis di elevate attività di Pta e di Ack, soprattutto in presenza di glucosio come sorgente di carbonio (Leighton et al., 2001).

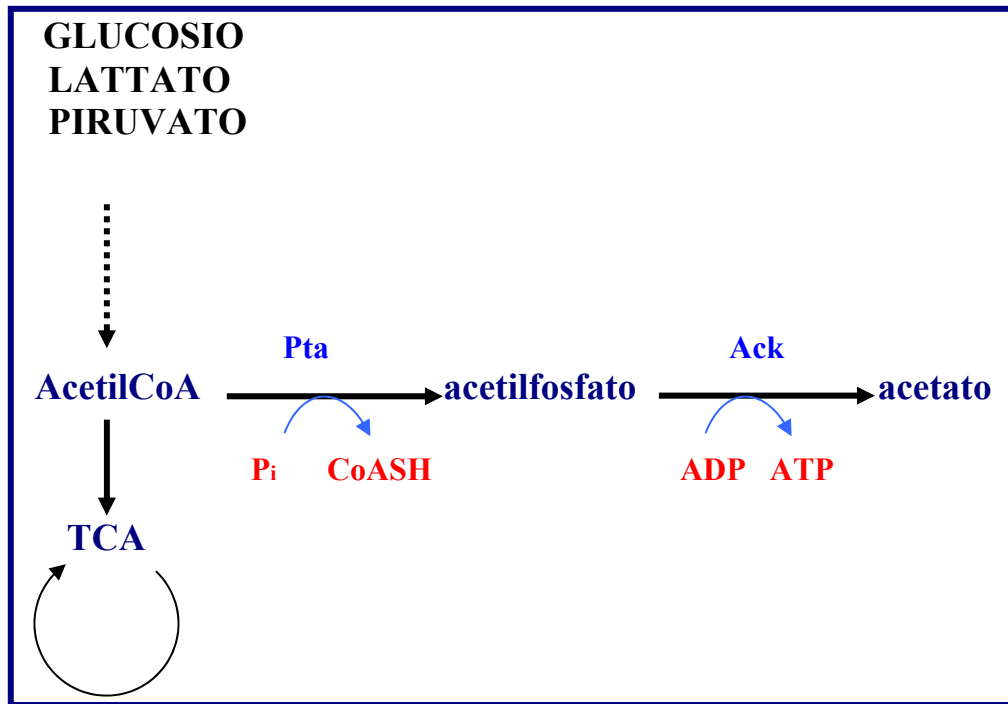


Figura 7. Rappresentazione schematica del *pathway* Pta-Ack.

Il primo enzima, Pta, converte il substrato di partenza, l'acetil-CoA, in acetilfosfato, il quale a sua volta viene trasformato dall'acetatochinasi, Ack, in acetato. La principale conseguenza di tale percorso metabolico è la riduzione della quantità di energia ottenuta da una singola sorgente di carbonio (glucosio, lattato, piruvato): questo ultimo, infatti, è deviato verso la produzione di acetato e non viene ossidato attraverso il ciclo TCA, energeticamente favorevole.

Tale via metabolica è, infatti, molto utilizzata da cellule batteriche cresciute in un mezzo in cui la sorgente di carbonio è in eccesso, in tali circostanze tutto il carbonio che entra nella cellula non riesce ad essere metabolizzato attraverso il ciclo TCA, e quindi, parte delle molecole di acetil-CoA prodotte intraprendono questa via alternativa (Pta-Ack) con

produzione di ATP, CoASH, ed acetato (Elmansi et al., 1998). Si può, quindi, affermare che il livello di acetilfosfato nel mezzo riflette lo stato nutrizionale della cellula: una sua elevata concentrazione corrisponde ad un eccesso di carbonio e viceversa (Wolfe et al., 2003).

Fino ad oggi non è stato ancora chiarito il significato fisiologico di questa via metabolica in *N. meningitidis*, tuttavia, la crescita del meningococco su differenti sorgenti di carbonio localizzate nei diversi siti dell'ospite, potrebbe influenzare le attività del *pathway* Pta-Ack alterando il *pool* intracellulare di acetilfosfato, e tale alterazione, potrebbe essere utilizzata dal batterio come segnale globale durante il processo patogeno (Mc Cleary et al., 1994), così come è stato dimostrato in *Vibrio cholerae* ed in *Streptococcus pneumoniae* in cui mutazioni nei geni che codificano la Pta e la piruvato ossidasi (enzima che converte il piruvato ad acetilfosfato in *S. pneumoniae*) ne alterano la virulenza (Chiang et al., 1998; Spellerberg et al., 1996).

Influenza del lattato sul metabolismo e sulla patogenicità di

N. meningitidis* e *N. gonorrhoeae

N. meningitidis e *N. gonorrhoeae* crescono efficientemente sul glucosio e sul lattato entrambi presenti nei siti in cui si verifica l'infezione *in vivo*, quali: le secrezioni genitali, gli essudati infiammatori ed il sangue per il gonococco, e l'epitelio mucosale nasofaringeo per il meningococco.

Anche in *N. gonorrhoeae* sono state identificate tre isoforme di lattico deidrogenasi FAD-dipendenti, associate alla membrana citoplasmatica e correlate al trasporto degli elettroni. In particolare, l'isoenzima LDH-1 utilizza esclusivamente il lattato come substrato, con una preferenza per l'isomero D. L'isoenzima LDH-2, invece, presenta una più ampia specificità di substrato (lattato, fenil lattato, 4 idrossifenil lattato) ma è stereospecifico per l'isomero L. Anche nel gonococco, come in *N. meningitidis*, è stata identificata una terza L-LDH FAD-

dipendente associata alla membrana; ed infine è presente una LDH citoplasmatica, NAD-dipendente (Smith et al., 2001; Fischer et al., 1994).

Studi condotti su cellule di *N. gonorrhoeae* cresciute in un mezzo contenente glucosio, hanno dimostrato che il lattato stimola il metabolismo batterico ed il consumo di ossigeno (Smith et al., 2001). Indagini di spettroscopia NMR mostrano che quando i gonococchi sono coltivati in un mezzo chimicamente definito, contenente glucosio e lattato, la gluconeogenesi di quest'ultimo non si verifica, ed il lattato è utilizzato solo come fonte di acetilCoA e di ATP attraverso la riduzione del NAD^+ (in assenza di glucosio, infatti, il lattato, oltre al ciclo TCA, deve anche alimentare la via della gluconeogenesi, allo scopo di permettere la sintesi dei carboidrati) (Yates et al., 2000; Yates et al., 2003).

La presenza di una rapida sorgente di NADH, di acetilCoA e, conseguentemente, di ATP è la probabile spiegazione della stimolazione del metabolismo del gonococco e dell'*uptake* dell'ossigeno, quando il lattato è aggiunto al mezzo contenente glucosio. Questa ipotesi è supportata dal fatto che anche il piruvato incrementa il tasso di crescita in presenza di glucosio (Smith et al., 2001).

Recentemente si è, pertanto, indagato sul possibile ruolo del lattato nei processi patogenetici. Il generale incremento del metabolismo promosso dal lattato potrebbe, infatti, determinare un incremento nella sintesi dei determinanti di virulenza, come ad esempio i pili di tipo IV, le proteine Opa e l'LPS che sono coinvolti nell'iniziale adesione ed interazione con le cellule epiteliali dell'ospite (Gao et al., 1998).

In realtà, questa considerazione può essere estesa anche ad altri batteri patogeni: *in vivo*, il lattato ed il glucosio sono presenti entrambi in numerosi siti d'infezione; si può, quindi, ipotizzare la presenza di un meccanismo comune, mediante il quale il lattato, in presenza di glucosio, influenza la patogenicità di svariati microrganismi (Smith et al., 2001). A conferma di tale ipotesi, un mutante lattato permeasi-difettivo è stato recentemente isolato in *N. meningitidis*, e nel modello sperimentale del ratto neonato, tale mutante presenta una

virulenza considerevolmente attenuata (Sun et al., 2000). Inoltre, mutanti difettivi per l'*uptake* del lattato sono stati utilizzati per comprendere il contributo di questa fonte di carbonio (energia) durante la fase di colonizzazione. Campioni di tessuto nasofaringeo sono stati inoculati con mutanti di meningococco lattato permeasi-difettivi e con ceppi selvatici. Dopo 18 ore dall'inoculo i mutanti lattato permeasi-difettivi sono isolati a livelli significativamente più bassi rispetto ai meningococchi *wild-type*. Tale risultato, non è dovuto a cambiamenti nell'espressione delle adesine o ad alterazioni dell'iniziale processo pilus-mediato di adesione alle cellule epiteliali, sembra, invece, che il lattato risulti un importante fonte di energia per il batterio durante la colonizzazione ed è necessario per la crescita nel tessuto nasofaringeo (Exley et al., 2005).

Pertanto, studi condotti in mutanti difettivi per l'*uptake* di altri specifici nutrienti potrebbero fornire importanti informazioni circa l'ambiente nel quale *N. meningitidis* sopravvive durante il processo infettivo.

CARATTERISTICHE GENERALI E PROPRIETA' DELLA GLUTAMMATO DEIDROGENASI

Caratteristiche generali della glutammato deidrogenasi

La glutammato deidrogenasi (GDH) è un enzima ubiquitario, che riveste un ruolo di primaria importanza nella cellula: rappresenta un punto di congiunzione tra il metabolismo del carbonio ed il metabolismo dell'azoto (Smith, 1975).

La funzione fisiologica di tale enzima può essere anabolica e/o catabolica, e ciò è generalmente stabilito dalla natura del cofattore associato: NAD^+ (NAD-GDH) o il NADP^+ (NADP-GDH). Di solito, gli enzimi NADP-GDH catalizzano l'assimilazione diretta dell'ammonio, mediante aminazione riduttiva del 2-oxoglutarato per formare L-glutammato (percorso anabolico).



Gli enzimi NAD-GDH, invece, catalizzano prevalentemente la reazione inversa ossia la deaminazione ossidativa del glutammato a 2-oxoglutarato ed ammonio (percorso catabolico).



Dal punto di vista strutturale, tutti gli enzimi GDH sono oligomerici ed, a seconda, delle dimensioni delle subunità e del numero dei monomeri, possono essere suddivisi in due tipi strutturali: GDH esameriche (con 6 subunità identiche di circa 50 KDa ognuna) e GDH tetrameriche (con 4 subunità identiche con peso molecolare di circa 115 KDa ognuna). La forma esamerica è tipica delle GDH NAD o NADP-dipendenti, della maggior parte delle specie batteriche note, delle GDH NADP-dipendenti dei bassi eucarioti e delle NAD(P)-GDH dei vertebrati, che posseggono un solo enzima GDH capace di usare come coenzima sia il

NAD^+ che il NADP^+ . La forma tetramerică è, invece, presente nella NAD-GDH dei bassi eucarioti (Minambres et al., 2000).

Glutammato deidrogenasi nei mammiferi

Nei mammiferi l'enzima GDH è localizzato a livello della matrice mitocondriale, dove svolge un ruolo fondamentale per il metabolismo dei gruppi amminici dei venti L-aminoacidi comunemente presenti nelle proteine.

I gruppi amminici sono, infatti, rimossi durante la loro degradazione ossidativa e trasferiti, mediante transaminazione, al 2-oxoglutarato con formazione di L-glutammato.



Il 2-oxoglutarato è, quindi, l'accettore comune dei gruppi amminici provenienti dalla maggior parte degli aminoacidi. L'L-glutammato che si forma in questa reazione, può subire una deaminazione ossidativa per azione della glutammato deidrogenasi, che utilizza NAD^+ come accettore delle entità riducenti, e canalizza l'azoto, sotto forma di ione ammonio, per la sintesi di altri composti azotati, quali nuovi aminoacidi e nucleotidi, o può essere escreto entrando nel ciclo dell'urea.



La glutammato deidrogenasi è di fatto responsabile della produzione di gran parte dell'ammoniaca che si trova nei tessuti animali, in quanto il glutammato è l'unico aminoacido il cui gruppo amminico può essere rimosso, in tal modo, con una efficienza elevata. L'ammoniaca può, inoltre, essere recuperata ed utilizzata nella sintesi degli aminoacidi. In questo caso la glutammato deidrogenasi catalizza la reazione inversa, riducendo il 2-oxoglutarato con formazione di glutammato, in una reazione NADP-dipendente.



La glutammato deidrogenasi dei mammiferi, pertanto, può utilizzare come cofattore sia il NAD che il NADP, tuttavia, essi vengono utilizzati in due diverse reazioni: il primo per il rilascio (deaminazione del glutammato) ed il secondo per la captazione di ammonio (aminazione del 2-oxoglutarato), il che si verifica rispettivamente durante la degradazione e la sintesi degli amminoacidi.

Tale enzima nei mammiferi è, inoltre, regolato allostericamente: è fortemente attivato dall'ADP ed è inibito dal GTP, pertanto, quando le cellule epatiche necessitano di energia (ATP), l'attività della GDH aumenta notevolmente, il gruppo amminico viene ceduto all' α -chetoglutarato per formare glutammato, che dal citosol è trasportato nei mitocondri dove è sottoposto a deaminazione ossidativa con donazione di elettroni al NAD^+ o al NADP^+ . Viceversa, l'accumulo di GTP nei mitocondri, come risultato di una elevata attività del ciclo degli acidi tricarbossilici, inibisce la deaminazione ossidativa.

Glutammato deidrogenasi nei procarioti

Tra i procarioti, vi sono microrganismi che posseggono sia la NAD-GDH che la NADP-GDH, il primo enzima è coinvolto nel catabolismo del glutammato, mentre il secondo sia nell'assimilazione dell'ammonio che nella sintesi del glutammato (Merrick, 1995).

Bacteroides fragilis, ad esempio, possiede due enzimi aventi attività di glutammato deidrogenasi: uno codificato dal gene *gdhA*, è una NAD(P)-GDH, può cioè utilizzare sia il NAD^+ che il NADP^+ come coenzima, l'altro codificato dal gene *gdhB* è, invece, NAD^+ specifico (Abrahams et al., 1998). La NAD(P)-GDH è attiva in presenza di elevate concentrazioni d'ammonio nel mezzo di crescita; i livelli di GDH NAD-specifica non sembrano, invece, essere influenzati dalla concentrazione d'ammonio, ma risultano incrementati in presenza di elevati livelli di azoto organico (peptidi). La più alta attività di

GdhB è stata infatti osservata quando *B. fragilis* è cresciuto in brodo BHI (*brain heart infusion*) o in mezzo minimo contenente triptone come unica sorgente di azoto. In queste condizioni l'attività NAD(P)-GDH è repressa. L'attivazione della NAD-GDH indotta dai peptidi, ha sollevato interesse circa il ruolo di questo enzima durante la crescita *in vivo* di *B. fragilis*. E' stato dimostrato, in particolare, che in relazione alla natura della sorgente di azoto, vi sono differenti livelli di produzione di proteasi, con una maggiore attività proteasica in presenza di azoto organico, piuttosto che di ammonio. L'azoto organico stimola anche l'attività della NAD-GDH che genera 2-oxoglutarato, utilizzato come substrato per le reazioni di transaminazione nella degradazione ossidativa degli aminoacidi (Abrahams et al., 1998). La regolazione di *gdhB* da parte dell'azoto organico può essere, quindi, correlata all'attività delle proteasi ed alla distruzione delle proteine *in vivo*, e quindi, alla patogenicità del batterio. Anche *Pseudomonas aeruginosa* presenta una NADP-GDH codificata dal gene *gdhA* e una NAD-GDH codificata dal gene *gdhB*, arginina-inducibile. L'arginina è, infatti, un nutriente fondamentale per tale microrganismo ed il *pathway* della arginina succiniltrasferasi (AST), che converte l'L-arginina a glutammato, è la principale via catabolica di questo amminoacido. Vari studi hanno stabilito che la proteina regolatoria ArgR, membro della famiglia AraC/XyIS di proteine regolatorie, attiva sia la trascrizione dell'operone *aru*, codificante gli enzimi del *pathway* AST, che la trascrizione di altri operoni per l'*uptake* ed il catabolismo dell'arginina, e reprime alcuni operoni della biosintesi di tale amminoacido. La trascrizione del gene *gdhB* inizia a partire da un promotore arginina-inducibile e richiede la presenza della proteina ArgR che, presumibilmente, agisce a livello di un sito operatore adiacente alla regione -35 del promotore arginina-inducibile. La NAD-GDH agisce, quindi, nel catabolismo dell'arginina, convertendo l'L-glutammato, prodotto del *pathway* AST, in 2-oxoglutarato che è successivamente incanalato nel ciclo TCA (Fig. 8) (Lu et al., 2001).

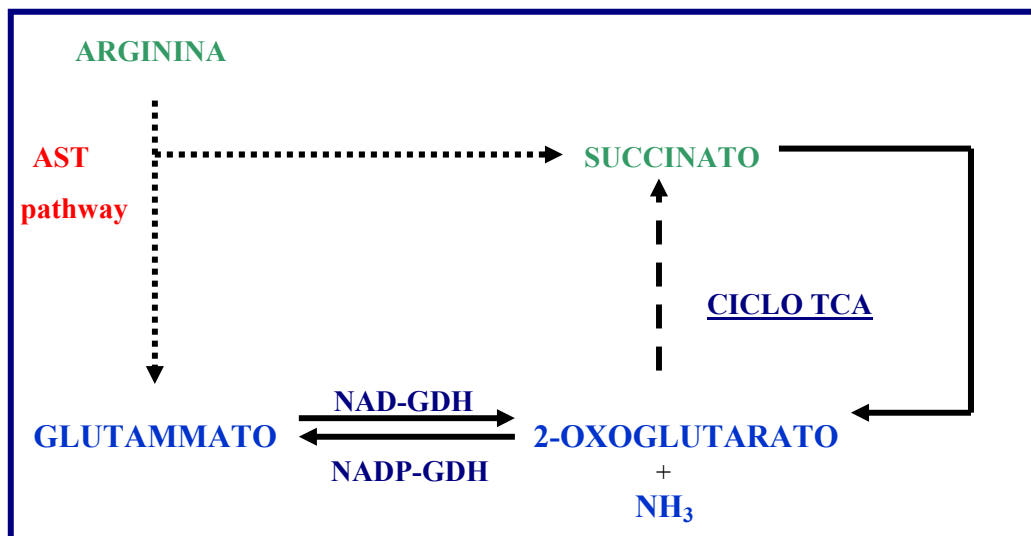


Figura 8. Catabolismo dell'arginina in *Pseudomonas aeruginosa*.

Vi sono, tuttavia, anche molte specie batteriche che posseggono una sola isoforma della glutammato deidrogenasi come *Escherichia coli* (McPherson et al., 1983), *Salmonella typhimurium* (Miller et al., 1984), *Klebsiella aerogenes* (Mountain et al., 1985), *Corynebacterium glutamicum* (Bormann et al., 1992), nei quali è presente solo la NADP-GDH, di tipo esamerico, codificata dal gene *gdhA*. Tale isoforma è coinvolta nell'assimilazione dell'ammonio piuttosto che nel catabolismo del glutammato.

Glutammato deidrogenasi in *Escherichia coli*

La glutammato deidrogenasi NADP-specifica di *E. coli* è una proteina esamerica, di 447 aminoacidi per subunità (McPherson et al., 1983; Sakamoto et al., 1975). L'allineamento della sequenza amminoacidica della GDH NADP-specifica di *E. coli* con la sequenza amminoacidica della proteina del fungo *Neurospora crassa* evidenzia una forte omologia (59% di identità, non considerando gli intervalli nell'allineamento). La comparazione delle sequenze proteiche procariotiche ed eucariotiche dimostra, quindi, che le GDH NADP-

specifiche sono enzimi altamente conservati (McPherson et al., 1983). Le regioni di forte omologia non sono uniformemente distribuite lungo la catena polipeptidica. L'identità più forte (oltre il 73%) è localizzata nella regione compresa tra l'aminoacido 57 e l'aminoacido 175 della sequenza di *E. coli*, tale regione è implicata nel legame dei substrati decarbossilati, nell'attività catalitica e nelle interazioni allosteriche. Si osserva, invece, una minore conservazione (48% di identità) nella regione che sembra rappresentare il dominio di legame del coenzima (McPherson et al., 1983).

A monte del gene *gdhA* di *E. coli* è stata rilevata la presenza di un possibile sito di legame per la proteina CRP (*cyclic AMP receptor protein*), sovrapposto alla regione -35 del promotore (Riba et al., 1988). La proteina CRP, è in grado di legare l'AMP ciclico, con formazione del complesso CRP-cAMP, che funge da attivatore trascrizionale: si lega al DNA e facilita il legame della RNA polimerasi al promotore più a valle (es. Operone del Lattosio) (Fig. 9).

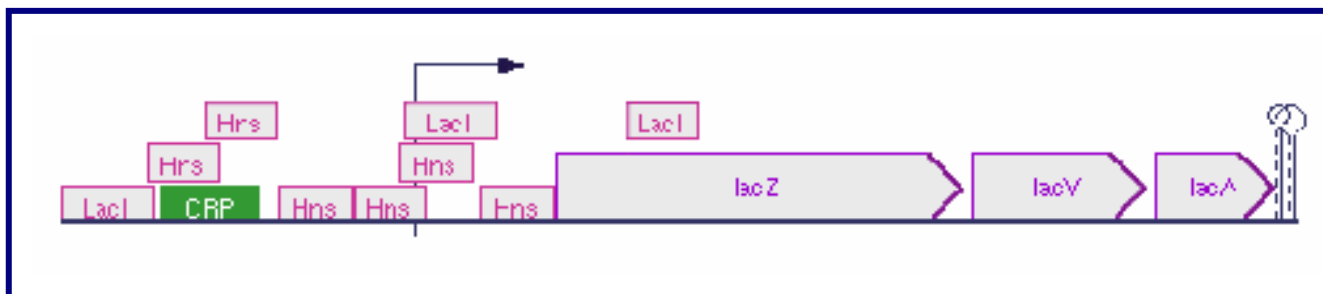


Figura 9. Regolazione CRP-dipendente dell'operone *Lac* di *E. coli*.

Il complesso CRP-cAMP, tuttavia, può anche svolgere il ruolo di repressore. Ciò avviene, in particolare, quando il complesso CRP-cAMP si sovrappone al promotore, come avviene a livello del gene *gdhA* di *E. coli*, impedendo l'accesso all'RNA polimerasi, e quindi, l'inizio della trascrizione.

Il ruolo di modulatore negativo, del complesso CRP-cAMP, sull'espressione del gene *gdhA*, è confermato dall'osservazione che l'attività di GDH, è più elevata in batteri cresciuti in

presenza di glucosio e di elevate concentrazioni di ammonio; in tali circostanze, poiché la concentrazione intracellulare di cAMP diminuisce, a causa di un probabile aumento della permeabilità della membrana citoplasmatica con conseguente fuoriuscita dell'cAMP intracellulare, è favorita la dissociazione del complesso CRP-cAMP ed il distacco del complesso dal DNA.

A valle del gene *gdhA* di *E. coli* si è osservata, inoltre, la presenza di sequenze REP (*repetitive extragenic palindromic*), distribuite in molteplici siti del genoma di tale microrganismo. Si è notato che la presenza di queste sequenze all'estremità 3' del gene, conferisce al corrispondente mRNA la capacità di formare strutture *stem-loop*, in conseguenza delle quali le sequenze REP possono influenzare l'espressione genica, impedendo la degradazione esonucleasica 3'-5' dell'mRNA. A conferma di tale ipotesi, si è osservato che delezioni delle sequenze REP riducono l'espressione del gene a monte; tali sequenze sembrano, pertanto, avere una funzione stabilizzante l'mRNA di *gdhA* di *E. coli* (Merino et al., 1987; Becerril et al., 1985).

Il sistema di regolazione dell'azoto, Ntr, degli enterobatteri

L'enzima NADP-GDH catalizza l'aminazione riduttiva del 2-oxoglutarato con formazione di glutammato, determinando in un unico percorso l'incorporazione dell'ammonio nei composti organici. L'ammonio, che rappresenta la principale sorgente di azoto negli enterobatteri, entrato nella cellula deve essere assimilato nelle molecole organiche al fine di essere utilizzato nei processi metabolici cellulari (Reitzer et al., 2001). La glutammato deidrogenasi determina, quindi, l'incorporazione dell'ammonio nel glutammato, il quale rappresenta l'intermedio chiave del metabolismo dell'azoto; da esso, infatti, derivano numerosi altri composti azotati tra cui: purine, pirimidine ed aminoacidi.

In molti microrganismi, nei lieviti e nelle piante superiori, è presente un percorso alternativo di assimilazione dell'ammonio, chiamato ciclo GS/GOGAT, in cui si assiste all'azione combinata di due enzimi: la glutammina sintetasi (GS) e la glutammato sintetasi (GOGAT). In questo ciclo, la glutammina sintetasi, catalizza l'aminazione (ATP-dipendente) del glutammato endogeno, con formazione di glutammina, secondo la seguente reazione:



La glutammato sintetasi, invece, è coinvolta nel trasferimento del gruppo aminico dalla glutammina al 2-oxoglutarato, con formazione di glutammato, secondo la reazione:



Si tratta, quindi, di un sistema accoppiato che richiede ATP e potere riducente, ma ha una resa più elevata rispetto al sistema di GDH, in quanto il secondo enzima è stimolato dal prodotto del primo.

L'attività del ciclo GS/GOGAT, è strettamente dipendente dalla disponibilità di ammonio nel mezzo di crescita: in particolare, è elevata in condizioni di scarse quantità di azoto, mentre, diminuisce in presenza di elevate concentrazioni dello stesso. Al contrario, la biosintesi di L-glutammato da parte della NADP-GDH, risulta efficiente solo ad elevate concentrazioni di ammonio, a causa della bassa affinità dell'enzima per quest'ultimo (Reitzer, 1996; Helling, 1994).

I circuiti regolatori coinvolti nelle vie di assimilazione dell'ammonio, sono stati studiati in maniera molto approfondita nelle *Enterobacteriaceae*, i meccanismi biochimici e genetici alla base di tale regolazione costituiscono il sistema globale di regolazione dell'azoto (Ntr).

Tale sistema richiede l'azione di 5 enzimi: un'adeniltrasferasi, codificato dal gene *glnE*, che catalizza l'adenilazione e la deadenilazione della glutammina sintetasi (GS), un enzima UTasi/UR (uridil trasferasi/ uridil *removing*), codificato dal gene *glnD*, una piccola proteina

trimerica PII, codificata dal gene *glnB*, una istidina proteina kinasi NtrB ed un regolatore della risposta NtrC, codificati, rispettivamente, dai geni *ntrB* ed *ntrC*.

Il modello schematico di funzionamento proposto per tale sistema prevede che l'enzima UTasi/UR, in presenza di bassi livelli di ammonio, modifichi covalentemente la proteina PII, mediante addizione di un gruppo UMP ad uno specifico residuo di tirosina, su ciascuna subunità della proteina. Dati di letteratura indicano che l'enzima UTasi/UR è capace di legare la glutammina, mentre la proteina PII può legare il 2-oxoglutarato (Merrick et al., 1995; Kamberov et al., 1995). Si ipotizza che in condizioni di limitazione d'ammonio, il 2-oxoglutarato legghi PII e ne induca un cambio conformazionale, che renda favorevole l'aggiunta di uridina, viceversa, in presenza di un eccesso di azoto, l'enzima UTasi/UR legghi la glutammina, che inibisce la reazione di uridilazione inducendo nell'enzima una conformazione che deuridila PII (Fig. 10). La risultante forma uridilata di PII promuove la deadenilazione di GS per azione di un'ATasi; viceversa, quando i livelli di ammonio sono elevati, predomina l'attività di rimozione dell'uridina da parte di GlnD, quindi PII viene deuridilato e in tal stato promuove l'adenilazione di GS mediante l'ATasi.

L'attività di GS è quindi regolata dall'adenilazione/deadenilazione, ossia dall'addizione o sottrazione covalente di un gruppo AMP ad uno specifico residuo di tirosina a ciascuna delle 12 subunità identiche che la costituiscono (Merrick et al., 1995). L'adenilazione di una subunità di GS, inoltre, inattiva solo quella subunità, l'enzima può, pertanto, esistere in un *range* di livelli di attivazione nella cellula, in particolare è più attivo in presenza di basse concentrazioni d'ammonio. Negli enterobatteri, il gene *glnA* che codifica GS, fa parte di un operone complesso indicato come *glnA ntrBC*, in cui *ntrB* codifica l'istidina proteina kinasi NtrB, e *ntrC* codifica il regolatore della risposta NtrC, una proteina dimerica che lega il DNA. Il gene *glnA* è espresso da due promotori in *tandem*, *glnA P1* e *glnA P2*, mentre i geni *ntrBC*, che mappano a valle, sono espressi sia mediante la trascrizione dell'intero operone a partire

dai promotori di *glnA*, sia da un promotore separato, *ntrBC* P, situato fra *glnA* e *ntrBC* (Dixon, 1984) (Fig. 11).

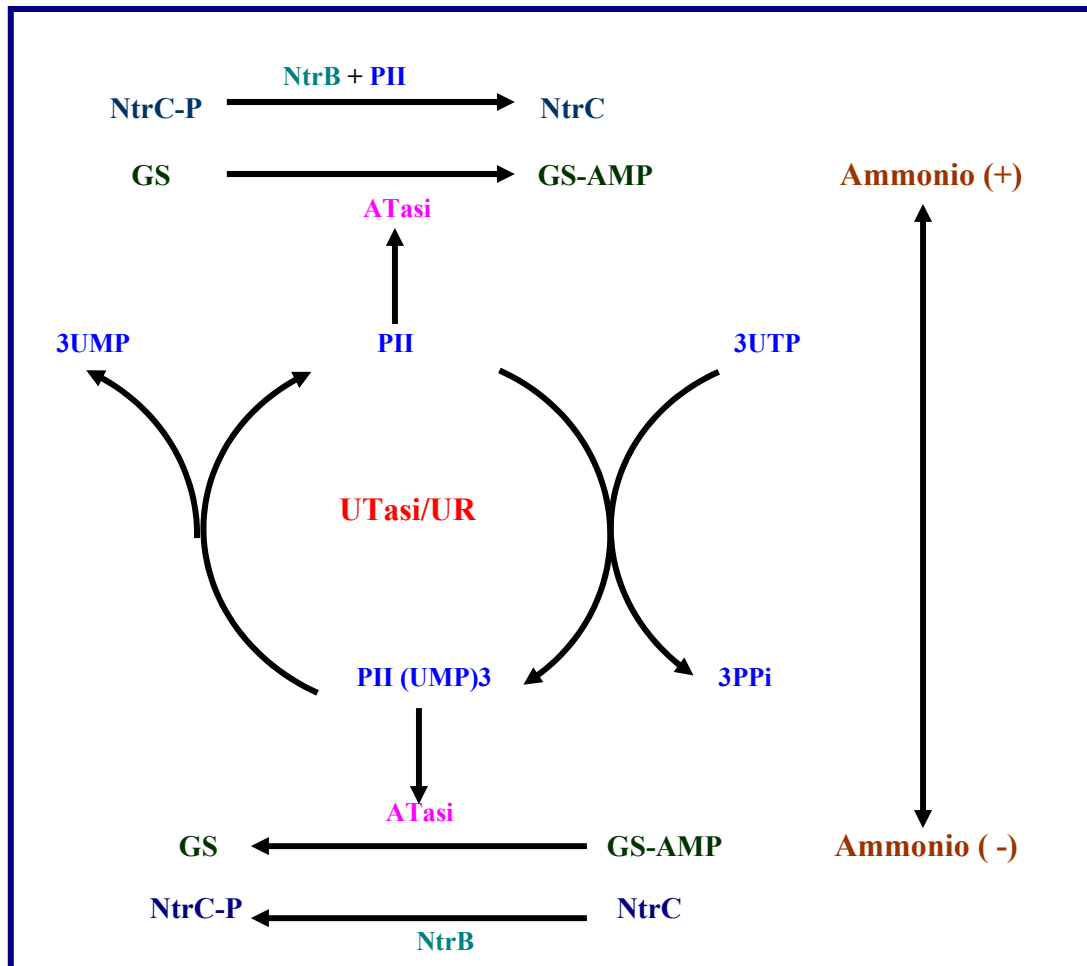


Figura 10. Modello schematico per la regolazione delle attività di GS e NtrC in risposta ai livelli di ammonio.

Quando l'ammonio è presente ad elevata concentrazione, il gene *glnA* è trascritto a partire da *glnA* P1, mediante una RNA polimerasi associata al fattore di trascrizione σ^{70} ($E\sigma^{70}$). La maggior parte di questi trascritti si ferma ad un debole terminatore Rho-indipendente, situato proprio a valle di *glnA*, e l'espressione dei geni *ntrBC* si verifica a partire da *ntrBC* P.

In condizioni di ammonio limitate, NtrC si trova nella forma fosforilata (NtrC-P) attiva, e in tale stato, lega un sito *enhancer* sovrapposto a *glnA* P1, reprimendo la trascrizione a partire da

tale promotore, mentre si attiva la trascrizione da *glnA* P2, mediante una forma minore di RNA polimerasi associata al fattore σ^{54} ($E\sigma^{54}$), e la trascrizione prosegue fino al termine dei geni *ntrBC* (Weiss et al., 1991).

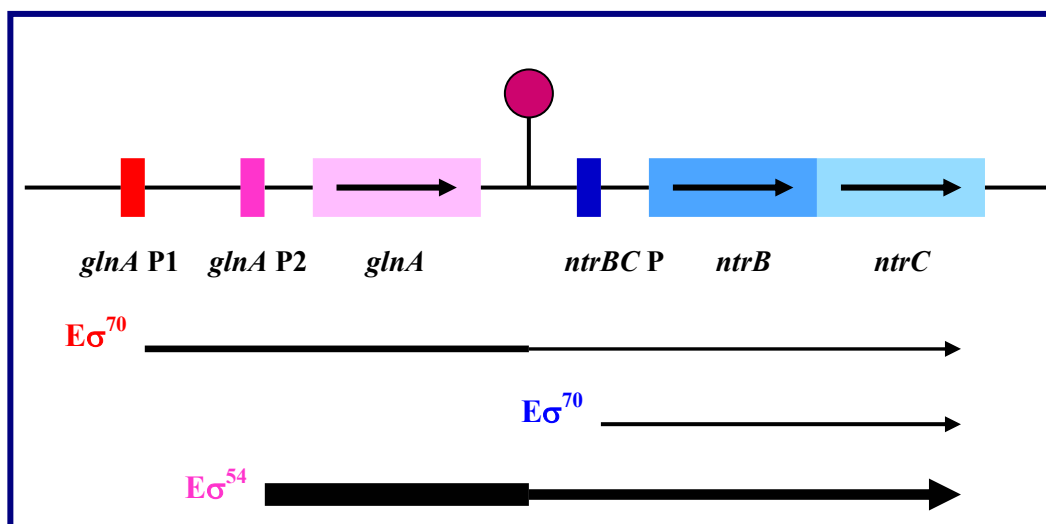


Figura 11. Operone *glnA ntrBC*.

NtrC-P legato all'*enhancer* contatta *glnA* P2, legato a $E\sigma^{54}$ mediante un ripiegamento del DNA (Fig. 12). Le sequenze *enhancer* sono tipicamente localizzate a circa 100 bp a monte del promotore cui si lega $E\sigma^{54}$; tale *enhancer* ha la funzione di facilitare l'oligomerizzazione della proteina NtrC, cioè la formazione di un complesso, contenente almeno due dimeri, richiesto per l'attivazione trascrizionale (Fig. 12). A differenza della trascrizione che parte dai promotori *glnA* P1 e *ntrBC* P, la quale garantisce una sintesi basale dei prodotti dell'operone in presenza di elevati livelli di ammonio, la trascrizione che parte da *glnA* P2, assicura, quindi, una espressione più marcata dei geni *glnA* e *ntrBC* in presenza di basse concentrazioni d'ammonio. In condizioni limitanti di ammonio, NtrC si trova nella forma attiva fosforilata, mentre, in condizioni opposte, si trova in forma inattiva o defosforilata, in quanto nelle condizioni in cui l'ammonio è limitante, la proteina PII si trova in forma uridinata e non può interagire con la proteina NtrB, la quale in una reazione ATP-dipendente, viene prima

fosforilata, e, successivamente, catalizza la fosforilazione e conseguente attivazione di NtrC (Ninfa et al., 1991). Quando l'ammonio è in eccesso, PII non è uridinato, ed in questa forma, oltre a promuovere l'adenilazione di GS, interagisce con NtrB, impedendone l'autofosforilazione e ponendolo in una configurazione tale da determinare la defosforilazione di NtrC: l'attivazione del promotore *glnA* P2 è, quindi, bloccata (Liu et al., 1995; Jiang et al., 1998; Atkinson et al., 1994).

Esiste, quindi, una doppia regolazione cui è sottoposto l'enzima GS: da un lato, infatti, c'è l'adenilazione covalente e reversibile che controlla l'attività dell'enzima, dall'altra, c'è un controllo trascrizionale da parte del sistema NtrB/NtrC. I due livelli di regolazione cooperano in modo da garantire il mantenimento di un adeguato *pool* intracellulare di glutammato, in condizioni sia di eccesso che di limitazione d'ammonio.

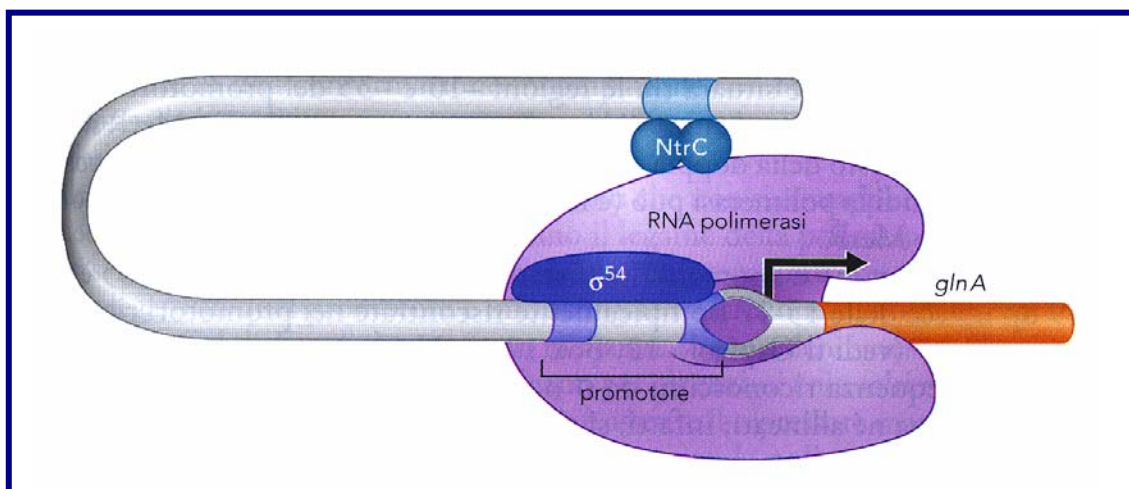


Figura 12. Attivazione trascrizionale mediata da NtrC sul promotore *glnA* P2.

Ruolo della proteina Nac nel sistema Ntr

Il sistema Ntr, oltre ad attivare l'espressione dell'operone *glnA ntrBC*, mediante l'azione della RNA polimerasi σ^{54} -associata, in condizioni di carenza di ammonio, esercita nelle stesse

condizioni una regolazione positiva sul gene *nac*, codificante la proteina di controllo dell'assimilazione dell'azoto, Nac.

Tale polipeptide, attiva la trascrizione di numerosi operoni, i cui prodotti possono rifornire la cellula di glutammato o ammonio da sorgenti organiche alternative. L'ammonio, infatti, è la sorgente di azoto preferita dagli enterobatteri, probabilmente a causa della rapida ed efficace utilizzazione da parte della cellula, la quale, tuttavia, deve essere in grado di utilizzare un ampio *range* di sorgenti alternative di azoto, e quindi, di attivare una serie di sistemi in grado di promuovere il metabolismo di differenti composti azotati, sistemi che in presenza di ammonio sono, normalmente, repressi.

In *Klebsiella aerogenes*, tra gli operoni attivati da Nac, vi sono gli operoni *hut*, *put* e *ure*, i quali codificano, rispettivamente, gli enzimi richiesti per il catabolismo di istidina, prolina ed urea (Janes e Bender, 1998; Macaluso et al., 1990). Nac, oltre ad attivare questi operoni, reprime la trascrizione di quei geni che hanno la funzione di assimilare ammonio, quando esso è presente in scarse quantità, come il gene *gdhA* codificante la glutammato deidrogenasi (Schwacha e Bender, 1993).

Il gene *nac* è stato identificato anche in *E. coli*, mentre è assente in *Salmonella typhimurium*, i cui livelli di glutammato deidrogenasi, non diminuiscono in presenza di basse concentrazioni d'ammonio (Muse et al., 1998; Camarena et al., 1998). Ciò indica che batteri strettamente correlati tra loro hanno, però, evoluto differenti sistemi di regolazione dell'attività di GDH.

Glutammato deidrogenasi in *N. meningitidis*

La presenza nel genoma di *N. meningitidis* di un gene codificante la NADP-GDH ed un gene codificante la NAD-GDH è stata solo di recente identificata, grazie al sequenziamento dell'intero genoma di ceppi di meningococco di sierogruppo A e B (Parkill et al., 2000;

Tettelin et al., 2000). E' stato, anche, identificato il gene codificante la glutammina sintetasi (GS), ma è assente il gene per la glutammato sintetasi (GOGAT), pertanto i meningococchi non sono in grado di effettuare il ciclo GS/GOGAT, suggerendo un maggior ruolo per l'NADP-GDH nell'assimilazione dell'azoto (Parkhill et al., 2000; Tettelin et al., 2000); inoltre, l'assenza di un fattore σ^{54} funzionale, implica la presenza di meccanismi di regolazione alternativi a quelli ben caratterizzati nelle *Enterobacteriaceae* (Laskos et al., 1998).

Studi biochimici dimostrano che le attività della GDH NADP- e NAD-dipendenti, hanno una diversa sensibilità alla temperatura (l'attività NAD-specifica è rapidamente annullata a 60°C, mentre quella NADP-specifica risulta inalterata a tale temperatura dopo 3 minuti) ed un diverso pH ottimale (pH 8 per NADP-GDH e pH 9 per NAD-GDH). Inoltre, l'attività dell'enzima NAD-dipendente diminuisce quando viene aggiunto glucosio al terreno minimo di crescita, mentre l'attività dell'enzima NADP-dipendente, aumenta nelle stesse condizioni (Holten, 1973).

Tali premesse, ci hanno indotto ad indagare sui meccanismi molecolari responsabili della regolazione dell'espressione del gene *gdhA* in isolati clinici di *N. meningitidis* che presentano differente attività della NADP-GDH.

E' noto che tutte le specie appartenenti al genere *Neisseria* posseggono due isoforme di GDH, una NAD-specifica ed una NADP-specifica, ad eccezione di *N. catarrhalis*, *N. ovis* e *N. caviae*, che probabilmente posseggono una GDH in grado di legare entrambi i coenzimi. *N. meningitidis*, possiede una attività maggiore della NADP-GDH, tuttavia, nelle specie non patogene, l'attività NAD-specifica risulta più alta, e quella NADP-specifica più bassa rispetto alle corrispondenti attività riscontrate in *N. meningitidis* e in *N. gonorrhoeae* (Holten, 1973).

TIPIZZAZIONE DEI CEPPI DI *N. meningitidis*

I ceppi di meningococco utilizzati in tale lavoro sperimentale, sono stati isolati negli ultimi trenta anni nel corso di episodi epidemici o piccole epidemie familiari in diverse aree del mondo, e sono stati classificati attraverso la mobilità elettroforetica dei loro enzimi metabolici e mediante l'analisi delle varianti alleliche ricorrenti in diversi loci, utilizzando le metodiche del *MultiLocus Enzyme Electrophoresis* e del *MultiLocus Sequence Typing*.

La distanza genetica tra gli isolati clinici di *N. meningitidis*, appartenenti alla nostra ceppoteca, è stata determinata comparando i *patterns* di RFLP (polimorfismi di lunghezza dei frammenti di restrizione) di otto geni *housekeeping* ed utilizzando una collezione di ceppi come riferimento (BL9513, linea III; 205900, *cluster* IV-1; 93/4286 e NGP165, linea ET-37; H44/76 ed MC58, linea ET-5) (Nei, 1975; Salvatore et al., 2001). È stata utilizzata la metodica del Southern blot per determinare i polimorfismi generati dalla presenza o assenza di siti di restrizione per l'enzima *Sau3AI* in regioni codificanti dei geni: *recA*, *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, *uvrD*, *rep*, *leuS*, *rho* (Sambrook e Russel, 2001). I frammenti genici sono stati amplificati dal DNA cromosomale del ceppo BL859, di sierogruppo B (linea III), mediante PCR. Al fine di ottenere una risoluzione elevata sono state utilizzate camere grandi per l'elettroforesi in gel di agarosio, ed in ogni analisi elettroforetica è stato incluso il DNA dei ceppi di riferimento. Le bande delle medesime dimensioni, sono state considerate identiche, ovvero corrispondenti allo stesso allele. La diversità genetica (h) ad un dato locus tra gli isolati è stata calcolata mediante la formula: $h = (1 - \sum x_i^2) / (n - 1)$, dove x_i è la frequenza di ogni i allele, e n è il numero di isolati. La distanza genica (D) tra gli isolati è stata calcolata come la proporzione di loci nei quali ricorrono alleli diversi, ed è stato costruito un dendrogramma partendo da una matrice, attraverso il metodo del *pair group cluster* (Fig. 13). I dati sono stati normalizzati con l'utilizzo di un coefficiente pesato, il contributo di ogni locus è stato rapportato al reciproco della media della diversità genica (Sneath e Sokal, 1973). L'analisi dei

patterns di RFLP ha consentito di stabilire le relazioni genetiche intercorrenti tra i ceppi, e la loro appartenenza ad un gruppo clonale o linea iper-virulenta: linea III, linea ET-5, linea ET-37 e linea IV-1.

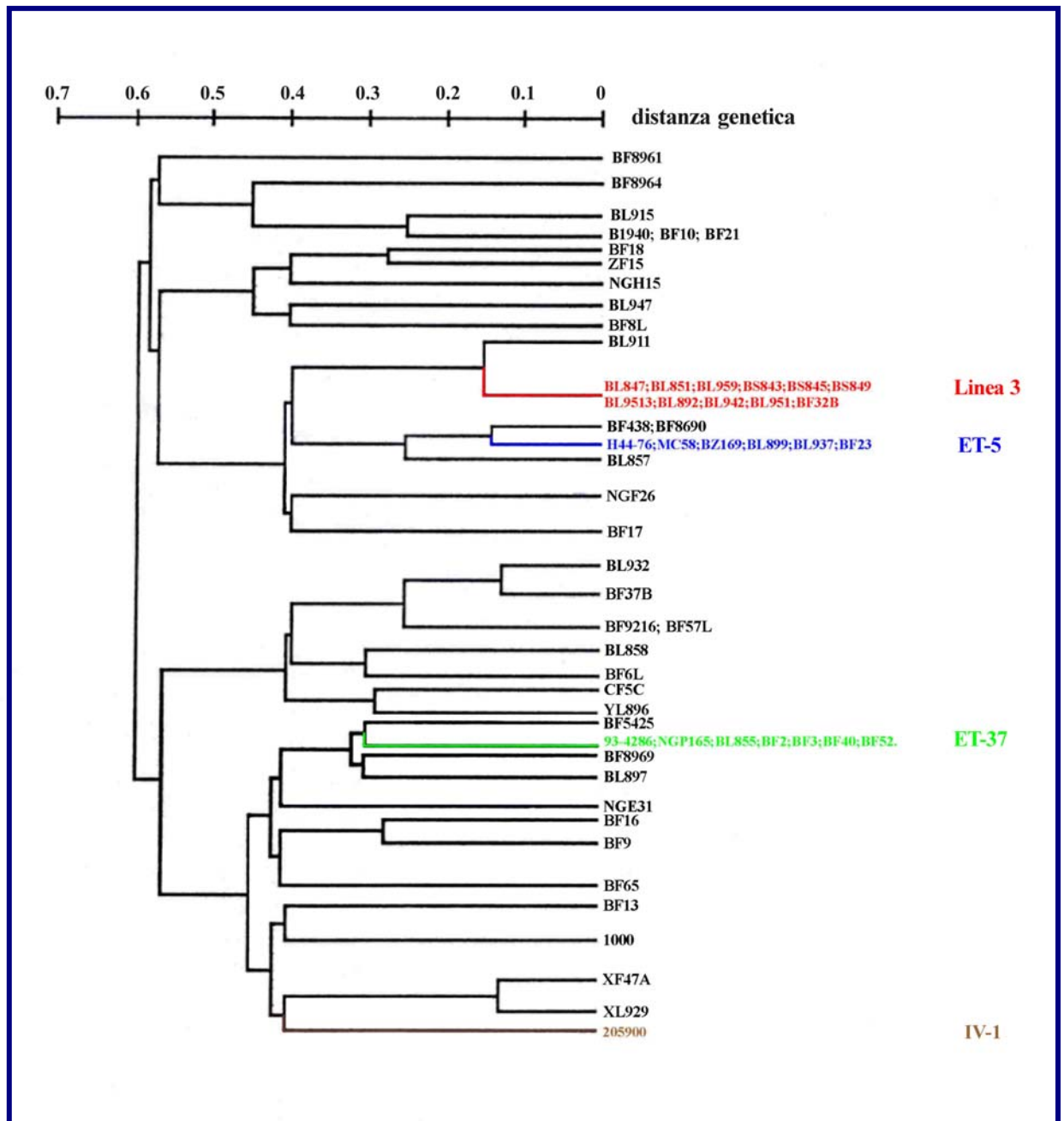


Figura 13. Dendrogramma: relazioni genetiche tra ceppi di meningococco.

SCOPO DELLA RICERCA

Nonostante i tanti progressi nella prevenzione e nel trattamento delle malattie infettive, ancora oggi, *N. meningitidis* è responsabile di gravi quadri patologici ed è una delle più frequenti cause di morte specialmente tra i bambini. Lo studio dei meccanismi molecolari alla base della patogenicità microbica e dei meccanismi di interazione ospite-parassita sono, quindi, fondamentali per la comprensione della dinamica dei processi infettivi e per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche. In particolare gli studi condotti al fine di comprendere la fisiologia e la biochimica di *N. meningitidis* non sono numerosi e risalgono ad una trentina di anni fa. Poche sono, pertanto, le conoscenze circa le possibili interazioni tra i processi metabolici e i meccanismi patogenetici che possono determinare l'innescare ed il perdurare dell'infezione meningococcica, in cui un fattore di cruciale rilevanza è la capacità del batterio di captare e sintetizzare nutrienti essenziali per la sopravvivenza nei differenti microambienti cui va incontro durante il processo infettivo.

Il presente lavoro di tesi si inserisce nell'ambito di un progetto sperimentale avente lo scopo di identificare i geni implicati nella patogenesi meningococcica e caratterizzare i meccanismi molecolari responsabili della regolazione dell'espressione genica differenziale in isolati clinici di *N. meningitidis*.

L'analisi del trascrittoma di numerosi ceppi di meningococco ha rivelato la presenza di svariate sequenze geniche differenzialmente o selettivamente espresse tra ceppi patogeni e commensali. Tra queste, è risultata di particolare interesse la sequenza genica *gdhA*, codificante l'enzima L-glutammato deidrogenasi NADP-specifico, ritrovato anche tra i 73 geni del genoma di *N. meningitidis* necessari per lo stabilirsi della batteremia nel modello sperimentale del ratto neonato. In questo studio è stata analizzata l'espressione differenziale di *gdhA*, i meccanismi molecolari che sono alla base della sua regolazione ed il suo probabile ruolo nella patogenesi dell'infezione meningococcica.

MATERIALI E METODI

Ceppi batterici e condizioni di crescita

I ceppi di *N. meningitidis* utilizzati in questo studio sono elencati in Tabella 1. I patogeni derivano da una collezione di ceppi isolati dal sangue e dal liquido cefalorachidiano di pazienti affetti da meningite, nel corso di episodi epidemici o di piccole epidemie familiari, verificatisi in diverse zone d'Italia nel corso degli ultimi vent'anni. In tabella sono, altresì, indicati i sierogruppi, i sierotipi, i siero sottotipi e la linea evolutiva di appartenenza dei vari ceppi presi in esame. In questo studio sono stati, inoltre, analizzati 24 ceppi commensali, isolati dal nasofaringe di soggetti sani nel corso dell'arruolamento militare o nell'ambito di un routinario programma di *screening* per la sorveglianza della malattia meningococcica in differenti aree geografiche in Italia e in Francia. Due ceppi, BL9513 E BF9513, sono stati isolati rispettivamente dal liquido cefalorachidiano e dal nasofaringe di un unico soggetto malato in Francia.

Tutti i ceppi di meningococco sono cresciuti su terreno complesso agar cioccolato (Becton-Dickinson), o su agar GC o in brodo supplementato con l'1% (v/v) di Polyvitox (Bio-Merieux, contenente: Vitamina B₁₂ 0.1mg; L-glutamina 100mg; Adenina SO₄ 10mg; Guanina•HCl 0.3mg; Acido p-aminobenzoico 0.13mg; L-cisteina 11mg; NAD 2.5mg; Cocarbossilasi 1mg; Nitrato ferrico 0.2mg; Tiamina•HCl 0.03mg; Cisteina•HCl 259mg; Destrosio 1g) a 37°C in presenza di CO₂ al 5%. L'MCDA (*Meningococcal Defined Agar*) è stato usato come terreno chimicamente definito, supplementato con glucosio (MCDA-glucosio) o lattato (MCDA-lattato). La concentrazione finale di ciascun componente dell'MCDA è la seguente: NaCl 100mM; KCl 2.5mM; NH₄Cl 7.5mM; Na₂HPO₄ 7.5mM; KH₂PO₄ 1.25mM; Na₃C₆H₅O₇•2H₂O 2.2mM; MgSO₄•7H₂O 2.5mM; MnSO₄•H₂O 7.5mM; L-acido glutammico 8.0mM; L-arginina 0.5mM; glicina 2.0mM; L-serina 0.2mM; L-cisteina•HCl•H₂O 0.06mM; glicerina 0.5% (vol/vol); CaCl₂•2H₂O 0.25mM; Fe₂(SO₄)₃

0.01mM. Nell'MCDA-glucosio, il glucosio è alla concentrazione finale dell'1%; nell'MCDA-lattato sono stati aggiunti 5 ml/litro di sciroppo commerciale al 60%. Il pH del terreno è stato portato a 7.4. Quando richiesto, il terreno è stato agarizzato mediante aggiunta di bacto-agar 1.5 % (w/v).

Il ceppo di *E. coli* DH5 α [F Φ 80d *lacZ* Δ M15 *endA1 recA1 hsdR17 supE44 thi-1 λ^- gyrA96 Δ (*lacZYA-argF*) U169]* è stato utilizzato nelle procedure di clonaggio, le cellule sono state cresciute in terreno Luria Bertani (LB) con aggiunta di ampicillina (50 μ g ml $^{-1}$), tetraciclina (10 μ g ml $^{-1}$), e cloramfenicolo (12.5 μ g ml $^{-1}$), quando richiesti.

Trasformazione dei meningococchi

Le colonie di meningococco, ottenute da crescita su terreno GC-agar per una notte, sono state raccolte e risospese in mezzo PPM (*Proteose Peptone Medium*), addizionato di Polyvitox all'1%, NaHCO $_3$ e MgCl $_2$ 10 mM, fino ad una densità ottica di 0.1 unità (a 550 nm) (Frosch et al., 1990). Ad 1 ml della sospensione batterica sono stati aggiunti da 500 ng ad 1 μ g di DNA plasmidico. La sospensione è stata incubata in agitazione vigorosa a 37°C per 4 ore. I trasformanti sono stati selezionati mediante piastramento su GC-agar contenente eritromicina (7 μ g/ml), incubando le piastre a 37°C in presenza di CO $_2$ al 5% per 20 ore.

Estrazione e purificazione del DNA cromosomale da ceppi

di *N. meningitidis*

I ceppi di meningococco sono stati cresciuti in terreno liquido GC fino ad una densità ottica di circa 1.0 unità a 550 nm. Le cellule sono state raccolte per centrifugazione a 3500 rpm per 20 minuti e sono state risospese in 4 ml di Tris-glucosio 50 mM a pH 8. La lisi batterica è stata effettuata con 400 μ l di lisozima 10 mg/ml; dopo 15 minuti a temperatura ambiente sono stati aggiunti EDTA 25 mM (pH 8) e SDS all'1%. Ottenuta la lisi batterica, è stata effettuata la

digestione delle proteine mediante trattamento con Proteinasi K (20 µg/ml) alla temperatura di 55°C per 2 ore. L'estrazione del DNA dalle proteine e dai componenti batterici lipofilici è stata realizzata mediante trattamento fenolo/cloroformio. La precipitazione del DNA cromosomale è stata effettuata con sodio acetato 3 M (pH 6.6) e 2,5 volumi di etanolo 100%. Il DNA è stato quindi recuperato con una bacchetta di vetro, e risospeso in Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM pH 8 ed RNAasiA 50 µg/ml.

Procedure di amplificazione mediante reazione a catena della polimerasi (PCR)

Gli oligonucleotidi utilizzati in questo studio come *primers* nelle reazioni di PCR sono i seguenti:

gdhA1: 5'-TCGTTGCCGAAGGTGCGAATATGC-3'

gdhR1: 5'-GACAGGGAATATCAGAGCCGTAACCG-3'

gdhR1-Bam: 5'-CGTCTAGGATCCATTCATACCTCCCAATCCTGCACG-3'

gdhR2-Nde: 5'-GGAGGACATATGAACTGGTAAGGCCTCAGAAAATC-3'

gdhA3: 5'-CAGGCAGGATTGTTGGCAATTCAGTC-3'

gdhAp1: 5'-CTGATGCCAAGCCCGATTTGGCAAAAATTGTTGAC-3'

gdhAp2: 5'-CTCCTGATTGGGATTGCGTTGTTTGAGGTTGGC-3'

gdhR3-Hind: 5'-GTGTTTAAGCTTCGGTGCGAGGTAAATGCCGTTGACGG-3'

gdhR4-Hind: 5'-GGTTTCAAGCTTGTTGCCGATGCGATGCTGGCGCAAGG-3'

Le reazioni di amplificazione consistono di 30 cicli che comprendono: 1 minuto a 94°C (*denaturation*), 1 min a 60°C (*annealing*) e 1-2 min a 72°C (*extension*). Tali reazioni sono state eseguite in un apparecchio Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler 480.

Allestimento di sonde radioattive e procedure di sequenziamento del DNA

La marcatura radioattiva delle estremità 5'-terminali dei frammenti di DNA è stata eseguita utilizzando l'enzima T4 polinucleotide kinasi e ATP marcato al fosfato in posizione γ con l'isotopo radioattivo ^{32}P . A tale scopo 1 μg di DNA, preventivamente defosforilato all'estremità 5'-terminale con Fosfatasi Alcalina (1U/ μl), è stato incubato in presenza di 2.5 U di T4 polinucleotide kinasi, 5 μl di γ ^{32}P -ATP (3.000 Ci/mmol) per 30 minuti a 37°C. Il volume della reazione è stato, successivamente, portato a 100 μl per aggiunta di H₂O distillata e la reazione è stata bloccata mediante trattamento termico a 85°C per 10 minuti. Sono stati, quindi, aggiunti 10 μl di *dye* (blu di bromofenolo 0.25 %, xilene cianolo 0.25 %, glicerolo 30 %), ed infine, le sonde sono state purificate su colonnina di Sephadex G50 mediante centrifugazione per 5 minuti a 1100 rpm, separandole dall'eccesso di nucleotide marcato.

La sequenza nucleotidica della regione dei promotori di *gdhA* è stata determinata attraverso sequenziamento di un prodotto di PCR di 362 bp, ottenuto mediante amplificazione del DNA cromosomale del ceppo MC58 con i *primers* *gdhA3* e *gdhAp2*. Le reazioni di sequenziamento del DNA sono state eseguite utilizzando il metodo di Sanger (Sanger et al., 1977), che prevede l'impiego di di-desossiribonucleotidi, utilizzando il kit *TAQence cycle sequencing* fornito dalla USB (distribuito da *Amersham Life Science*) in accordo con le istruzioni dei produttori. L'analisi delle sequenze di DNA è stata eseguita utilizzando il *software* “*Genejockey Sequence Processor*” (pubblicato e distribuito da Biosoft). Il CDD (*database di domini conservati*), il servizio *CD-Search* ed il *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) sono stati usati per identificare i domini conservati presenti nelle sequenze proteiche.

Analisi del DNA mediante Southern blot

Il DNA cromosomale estratto dai ceppi di *N. meningitidis* è stato trattato con appropriati enzimi di restrizione ed i prodotti della digestione sono stati frazionati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio 0.8% in TBE 1X (il buffer TBE 1X contiene: Tris-borato 8,9 mM, acido borico 89 M, EDTA 2 mM).

Il DNA è stato trasferito su supporto di Nylon attivato (Hybond N⁺), mediante *blot* alcalino in presenza di SSC 10X (SSC 1X: 15 mM NaCl, 15 mM Sodio-Citrato, pH 7). La reazione di ibridazione è stata effettuata utilizzando la soluzione “Church” 0.5 M (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ a pH 7.2 e SDS al 7%), in agitazione a 65°C per una notte. Alla soluzione di ibridazione è stata aggiunta la sonda marcata con [α -³²P]-ATP (400Ci mmol⁻¹) e [α -³²P]-GTP (400Ci mmol⁻¹) attraverso *random priming* usando il frammento Klenow della DNA polimerasi I di *E. coli*, come da protocolli standard. La quantità di sonda aggiunta è stata calcolata in base all’attività specifica della stessa.

Per eliminare l’eccesso di sonda i filtri sono stati lavati in presenza di 40 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ a pH 7.2 e SDS all’1% a 65°C, ripetendo l’operazione più volte e monitorando la radioattività con un contatore *Geiger*.

Plasmidi e procedure di clonaggio

Il plasmide pNLE-orf1.2, è stato ottenuto mediante amplificazione della regione genomica contenente *orf1-orf2* dal ceppo NGP165 utilizzando i *primers* *gdhA1* e *gdhR1*. L’amplicone è stato digerito con gli enzimi di restrizione *HincII* e *DraI*, che danno luogo ad un frammento di 1094 bp, ed è stato clonato nel sito *SmaI* del vettore pNDE1 (Bucci et al., 1999).

Il plasmide pDE Δ gdhR, deriva dal vettore pDEX nel cui sito *BamHI* è stato inserito un frammento di DNA *Sau3AI* di 540 bp, contenente la regione centrale del gene *gdhR*. Il plasmide pDEX è stato ottenuto inserendo, rispettivamente un frammento *KpnI* di 860 bp,

contenente il gene *ermC*, ed un frammento *EcoRI* di 382 bp, contenente la sequenza DUS (DNA uptake sequence) di *Neisseria*, nei siti *KpnI* et *EcoRI* del vettore pUC19. I frammenti *KpnI* di 860 bp ed *EcoRI* di 382 bp derivano dal plasmide pNDE1 (Bucci et al., 1999).

Il plasmide pET-GdhR, è stato ottenuto inserendo nei siti di restrizione *BamHI* ed *NdeI* del plasmide pET15b (Novagen), il frammento di PCR di 799 bp ottenuto con i *primers* *gdhR1-Bam* e *gdhR2-Nde*.

Per costruire il vettore pACgdhR, è stato amplificato il gene *gdhR* dal ceppo MC58 utilizzando i *primers* *gdhR3-Hind* e *gdhR4-Hind*. Il prodotto di PCR di 1234 bp è stato clonato nel sito *HindIII* del vettore pACNL1, un derivato del vettore pACYC184 contenente nel sito *BamHI* un frammento *Sau3AI* di 1480 bp fiancheggiante la regione *leuS* meningococcica (Salvatore et al., 2000).

Estrazione dell'RNA totale

I ceppi di meningococco sono stati cresciuti in terreno liquido GC o in terreno MCDA-glucosio o MCDA-lattato, in agitazione a 37°C fino ad 1.0 OD_{550nm}. Le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione a 3000 rpm per 15 minuti, ed incubate a -80°C per una notte. Gli sferoplasti sono stati preparati, mediante trattamento con lisozima (1mg/ml), e risospesi in una soluzione contenente: guanidina idrocloruro 8 M, acetato di sodio 50 mM pH 5 e DTT (ditiotreitolo) 1 mM. La lisi batterica è stata ottenuta mediante l'aggiunta di una miscela 24:1 di cloroformio ed alcool isoamilico, agitando e sottoponendo la mistura a centrifugazione a 5000 rpm per 10 minuti. L'RNA totale è stato precipitato con etanolo alla temperatura di -20°C per 45 minuti. Dopo centrifugazione a 5000 rpm per 10 minuti, è stata aggiunta una soluzione di guanidina-HCl 8 M ed EDTA 20 mM a pH 5, ripetendo il passaggio 2-3 volte. L'estrazione dell'RNA dal complesso guanidina-HCL, è stato ottenuto addizionando EDTA 20 mM, cloroformio e butanolo, agitando e sottoponendo la mistura a

centrifugazione (5000 rpm per 10 minuti). La precipitazione dell'RNA è stata effettuata in presenza di acetato di sodio 3 M a pH 6.

L'analisi elettroforetica dell'RNA è stata eseguita mediante frazionamento dell'RNA totale su gel di agarosio/formaldeide all'1.5%, utilizzando MOPS 1X (preparazione per un litro: 41.86 g MOPS, 6.8 g acetato di sodio, 3.5 g EDTA) come buffer di corsa.

Analisi dei trascritti mediante Northern blot

L'RNA totale, frazionato su gel di agarosio/formaldeide all'1.5%, è stato trasferito su supporto di Nylon (Hybond N⁺) mediante *blot* salino in presenza di una soluzione di SSC 10X. La reazione di ibridazione è stata effettuata utilizzando la soluzione “*Church buffer*” 0.5 M, in agitazione a 65°C per una notte.

Il frammento *Hinc*II di 142 bp ed il prodotto di PCR di 799 bp, ottenuto con i *primers* *gdhR1*-Bam e *gdhR2*-Nde, sono stati utilizzati rispettivamente come sonda *gdhA*-specifico e *gdhR*-specifico, e marcati con ³²P come precedentemente descritto.

Per eliminare l'eccesso di sonda i filtri sono stati lavati in presenza di 40 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ a pH 7.2 e SDS all'1% a 65°C per 10 minuti ripetendo l'operazione più volte e monitorando la radioattività con un contatore *Geiger*. I filtri così ottenuti sono stati sottoposti ad autoradiografia.

Analisi dei trascritti mediante Slot blot

Esperimenti di Slot blot sono stati eseguiti secondo le procedure standard (Sambrook e Russel, 2001). L'RNA batterico totale è stato estratto come precedentemente descritto, denaturato a 80°C per 5 minuti ed immobilizzato su filtri di *nylon* mediante lenta filtrazione in un apparato di Slot blot (Schleicher e Schull). L'RNA immobilizzato è stato poi ibridizzato agli oligonucleotidi *gdhAp1* e *gdhAp2* a singolo filamento, marcati all'estremità 5'-terminale,

per evidenziare i trascritti *gdhA*-specifici prodotti a partire dai promotori *gdhA* P1 e *gdhA* P2. Le reazioni di ibridazione sono state eseguite in SSC 5X, SDS 0.5 % e 0.5X di *Denhardt solution* (Sambrook e Russel, 2001) a 68°C per 6 ore.

Saggio di Primer extension

A circa 20 µg degli RNA totali estratti dai ceppi MC58 (ET-5), 205900 (IV-1), NGP165 (ET-37) e a 2 µl di RNA di lievito (10 µg/µl), utilizzato come controllo, sono stati aggiunti 60 ng/µl dell'oligonucleotide *gdhAp2* marcato all'estremità 5'-terminale. Si è portato a volume di 50 µl con H₂O ed è stato aggiunto acetato di sodio 0.3 M a pH 6.6 ed etanolo al 100%. La reazione di precipitazione è stata effettuata a -20°C per una notte. I campioni sono stati quindi centrifugati a 13000 rpm per 10 minuti a 4°C, il sovrnatante è stato aspirato ed il *pellet*, dopo un lavaggio con etanolo 80 % freddo, è stato asciugato a temperatura ambiente e risospeso in 8 µl di TE 1X (il buffer TE 1X contiene: Tris-HCl 10 mM pH 8.0 e EDTA 1 mM pH 8.0) a cui sono stati addizionati 2.2 µl di KCl 1.25 M.

I campioni risospesi sono stati incubati a 50°C per 15 minuti. Ad ogni campione sono stati aggiunti 24 µl di *primer extension mix* così composta: Tris HCl 20 mM pH 8.6, MgCl₂ 10 mM, dNTPs 1 mM. Sono stati, poi, aggiunti a ciascun campione 2.5 µl di DTT (riducente che ottimizza l'attività della retrotrascrittasi), 0.1 U.I./µl di proteina inibitrice dell'RNasi ed 1 µl di trascrittasi inversa SuperScriptTM (Gibco BRL). La reazione è stata incubata a 42°C per 1 ora e, poi, bloccata aggiungendo TE 1X pH 7.6, fenolo pH 8.0 e cloroformio, centrifugando per 4 minuti a temperatura ambiente; è stato, quindi, recuperato il sovrnatante e si è proceduto con la precipitazione aggiungendo ammonio acetato 10 M e 3 volumi di etanolo al 100%, incubando a -20°C per una notte. I campioni sono stati, quindi, centrifugati per 10 minuti a 4°C, è stato allontanato il surnatante ed il *pellet* è stato lavato con etanolo 80 % freddo, lasciato asciugare a temperatura ambiente e poi risospeso in 10 µl di *dye* denaturante

composto da: xilene cianolo 0.25 %, glicerolo 30 %, formammide 80 %. I campioni sono stati incubati a 95°C per 8 minuti e, posti in ghiaccio per 1 minuto, prima di essere sottoposti a corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide/urea denaturante al 6 % nel tampone di corsa TBE 1X. Al termine della corsa elettroforetica il gel è stato posto in CH₃COOH al 10 % per 15 minuti, lavato abbondantemente sotto acqua corrente, lasciato asciugare per tutta la notte, e sottoposto ad autoradiografia.

L'analisi quantitativa dei differenti trascritti è stata eseguita mediante densitometria utilizzando lo Scanmaster 3 (Howtek, Inc., Hudson, NH), uno scanner a colori ad alta risoluzione fornito del programma RFLPrint TM (Pdi, Huntington Station, NY), o valutando direttamente la radioattività delle bande mediante un PhosphoImager SI (Molecular Dynamics, Inc., Sunnyvale, CA).

Analisi del trascrittoma

Il DNA genomico derivante dal ceppo invasivo B1940 è stato digerito parzialmente con l'enzima di restrizione *Sau3AI* ed i prodotti di tale digestione sono stati clonati nel vettore pUC19. Il ceppo di *E. coli* DH5 α è stato utilizzato come ceppo ricevente per selezionare oltre 3000 cloni ricombinanti. Il DNA plasmidico è stato estratto da ciascun clone secondo le procedure standard (Sambrook e Russel, 2001) e digerito con *EcoRI*. Ciascun campione di DNA è stato caricato, in triplicato, su gel di agarosio all'1.5% in TAE 1X (il buffer TAE 1X contiene: Tris acetato 40 mM ed EDTA 1 mM) e successivamente trasferito su membrane Hybond (Amersham) mediante *blot* alcalino. I tre set di cloni sono stati ibridizzati con il cDNA totale marcato proveniente da due ceppi invasivi MC58 (ET-5) e B1940, e dal ceppo commensale BF21 (Tab. 1). Le sonde di cDNA totale sono state ottenute mediante incorporazione di [α -³²P]-ATP (3000 Ci mmol⁻¹) e [α -³²P]-GTP (3000 Ci mmol⁻¹) in reazioni *in vitro* catalizzate dalla retrotrascrittasi SuperScriptTM (Gibco BRL), utilizzando l'RNA totale

come *template* ed oligonucleotidi *random* (esameri) come *primers*. Tale procedura consente di individuare specie di mRNA presenti nella popolazione iniziale ad una frequenza di almeno 1 su 200 (Sambrook e Russel, 2001). L'ibridazione mediante Southern blot è stata eseguita come descritto precedentemente. Le reazioni di ibridazione sono state eseguite in SSC 5X, SDS 0.5%, 0.5X Denhardt (Sambrook e Russel, 2001), e 0.05 mg ml⁻¹ di DNA di timo di bue, a 68°C per 12 ore.

Analisi dell'attività di NADP-GDH

Gli estratti crudi (S30), sono stati preparati dal ceppo di meningococco *wild-type* MC58 e dal congenico MC58ΩgdhR, cresciuti in terreno GC a 37° C. La crescita delle cellule è stata arrestata a 0.8, 1.0 ed 1.2 OD_{550nm}, mediante centrifugazione a 3500 rpm per 20 minuti, ed i batteri sono stati risospesi in 5 ml di un buffer contenente PBS (*phosphate-buffered saline*) 1X, β-mercaptoetanolo 5 mM, una *mix* di inibitori della proteasi 1X (Roche Diagnostics), DNAsi 5 µg/ml, RNAasiA 5 µg/ml (Sigma). Le cellule sono state lisate meccanicamente con un sonicatore, SONOPLUS modello HD-2070 (otto cicli di 30 secondi ciascuno, con un intervallo di 30 secondi tra un ciclo e l'altro). Dopo centrifugazione a 13000 rpm per 30 minuti a 4°C, il surnatante è stato usato come estratto cellulare. La concentrazione proteica è stata determinata con il metodo Bradford, con l'albumina di siero bovino come standard. L'attività della NADP-GDH è stata misurata spettrofotometricamente (DU6S Spectrophotometer Beckmman) registrando il tasso di ossidazione del NADPH (indicato da un aumento nell'A₃₄₀) in ciascuna delle miscele ottenute, aggiungendo: 300 µg di estratto cellulare, acido 2-oxoglutarico 10 mM, NADPH 0.25 mM, NH₄Cl 40 mM, TRIS buffer 50 mM a pH 8.0. La reazione è stata poi bloccata aggiungendo HCl 0.67 N. I risultati, corretti tenendo conto dell'attività NADPH endogena, sono espressi come nmoli di NADPH ossidato

(37°C, pH 7.6) $\text{min}^{-1}\text{mg proteina}^{-1}$. L'attività misurata è stata comparata con quella del ceppo MC58 cresciuto fino ad 1.2 OD_{550nm}, assunta arbitrariamente pari al 100%.

Preparazione degli estratti cellulari e purificazione della proteina

Gli estratti crudi (S30) sono stati preparati da cellule di *E. coli* BL21λDE3 ($F^- \text{omp}^+ \text{tr}_B^- m_B^-$), trasformate con i plasmidi pET15b (un vettore di espressione contenente una sequenza genica codificante per un *tag* di istidina ed un gene che conferisce resistenza all'ampicillina come marcatore selettivo), o pET-GdhR, un derivato del plasmide pET15b nel quale è stata clonata la sequenza genica di *gdhR*. Le cellule trasformate sono state cresciute in terreno LB fino alla precoce fase logaritmica e indotte con iso-propil-tio-galattoside (IPTG) 0.5 mM per 2 ore a 37°C. Le cellule (BL21-pET-gdhR) sono state successivamente raccolte mediante centrifugazione a 5000 rpm, e risospese in 4 ml di un buffer contenente: Hepes 20 mM pH 8.2, KCl 100 mM, EDTA 0.2 mM, PMSF (fenil metil sulfonil fluoruro) 0.5 mM, DTT 0.5 mM, glicerolo 20%, al quale è stato aggiunto lisozima 200 µg/ml, ed incubando per 1 ora e 30 minuti a 4°C. Le cellule così risospese sono state sonicate, in ghiaccio, effettuando otto cicli di 30 secondi ciascuno, con un intervallo di 30 secondi tra un ciclo e l'altro. Dopo centrifugazione a 12000 rpm per 30 minuti a 4°C, il surnatante è stato utilizzato come estratto crudo. La presenza di His-GdhR è stata controllata mediante SDS-PAGE.

L'induzione delle cellule di *E. coli* trasformate con pET-GdhR determina la comparsa di una proteina ricombinante GdhR con un *tag* di istidine, con un apparente peso molecolare di 31500 Da, in accordo con il peso molecolare atteso di 31624 Da dedotto sulla base della sequenza aminoacidica. La proteina ricombinante His-GdhR è stata parzialmente purificata dagli estratti S30, mediante un protocollo di purificazione a rapida affinità in accordo con le procedure del Novagen pET system manual.

Analisi di Gel mobility shift

La regione genomica contenente l'intera regione dei promotori di *gdhA*, è stata amplificata utilizzando gli oligonucleotidi *gdhA3* e *gdhAp2*. Il prodotto di PCR di 362 bp è stato digerito con l'enzima di restrizione *SspI* generando un frammento distale di 119 bp ed uno prossimale di 244 bp.

Il frammento di DNA di 244 bp, che fiancheggia il promotore *gdhA* P2, è stato marcato all'estremità 5'-terminale con [γ - 32 P]-ATP (3000 Ci mmol⁻¹), ed utilizzato come sonda in un esperimento di Gel mobility shift, lo stesso frammento non marcato è stato utilizzato come competitore freddo. L'analisi di Gel mobility shift è stata eseguita miscelando a 24°C la proteina His-GdhR, la sonda marcata, il DNA competitore non marcato ed il *binding buffer* in un volume totale di 20 μ l. La composizione finale del *binding buffer* è la seguente: Hepes 20 mM pH 8.2, KCl 40 mM, Ficoll 4%, Spermidina 5 mM, poly (dIdC) 0.25 μ g/ μ l. La proteina His-GdhR è stata impiegata alla concentrazione di 0.29 ng/ μ l (10 nM) e la sonda alla concentrazione di 0.24 ng/ μ l (1 nM) (20.000 CPM). Quando indicato, la proteina His-GdhR è stata pre-incubata con piruvato 10 mM, L-lattato 10 mM, L-glutammato 10 mM o 2-oxoglutarato 10 mM per 5 min a 24°C in *binding buffer*, prima dell'aggiunta della sonda. Il competitore non marcato è stato addizionato da 20 a 100 volte in eccesso rispetto al DNA marcato. La *mix* è stata incubata per 10 min a 24°C prima del caricamento su un gel di agarosio all'1.5% in buffer TBE 0.5X, e l'elettroforesi è stata eseguita a 24°C.

RISULTATI

Espressione differenziale di *gdhA* in isolati clinici di *N. meningitidis*

La nostra analisi è partita dalla messa a punto di uno *screening* sistematico per l'identificazione di geni differenzialmente e/o selettivamente espressi in ceppi di *N. meningitidis* isolati da soggetti malati (ceppi patogeni), e da soggetti sani (ceppi commensali). A tale scopo, una libreria genomica proveniente dal ceppo patogeno B1940 è stata parzialmente digerita con l'enzima di restrizione *Sau3AI*, ed i frammenti ottenuti sono stati confrontati con i cDNA totali marcati provenienti da differenti isolati clinici di meningococco. Questa strategia ha condotto all'isolamento di numerose sequenze di DNA differenzialmente espresse nei ceppi patogeni e commensali (dati non mostrati). Fra le sequenze identificate, è stato individuato un frammento *Sau3AI* di 743 bp, corrispondente al gene *gdhA*, codificante l'enzima L-glutammato deidrogenasi NADP-specifico.

Per confermare tale risultato l'mRNA *gdhA*-specifico, proveniente da differenti ceppi di meningococco cresciuti fino alla media fase logaritmica (0.6 OD_{550nm}), è stato analizzato mediante Northern blot. La sonda *gdhA*-specifico, un frammento *HincII* di 142 bp marcato con ³²P (Fig. 14A), ha evidenziato un mRNA lungo circa 1400 nt (Fig. 14B), coerente con la lunghezza di un trascritto monocistronico che parte dalla regione del promotore di *gdhA* e termina immediatamente a valle dello stesso. L'analisi della sequenza del gene *gdhA* dei ceppi di meningococco disponibile nella banca dati NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) ha rivelato, infatti, l'esistenza di un probabile terminatore della trascrizione Rho-indipendente bi-direzionale, contenente una sequenza DUS (*DNA uptake sequence*), in tutti e tre i ceppi sequenziati: MC58 (sierogruppo B, linea ET-5), Z2491 (sierogruppo A, *cluster* IV-1) e FAM18 (sierogruppo C, linea ET-37) (Fig. 15).

L'esperimento di Northern blot ha evidenziato differenti livelli di mRNA *gdhA*-specifico tra i ceppi esaminati: si osserva una sovra-espressione nei ceppi 205900 (Fig. 14B, corsia 1) ed MC58 (Fig. 14B, corsia 3), appartenenti, rispettivamente, alle linee ipervirulente IV-I ed ET-5, ed una ridotta espressione nei ceppi NGP165 (corsia 2), BL892 (corsia 5), B1940 (corsia 6) e 1000 (corsia 4).

Le differenze quantitative nei livelli di mRNA, riscontrate nei vari ceppi di *N. meningitidis* analizzati, hanno stimolato interesse per la comprensione del significato fisiologico e patogenetico della sovra-espressione di *gdhA* nei ceppi invasivi. L'analisi è stata, pertanto, estesa ad un'ampia collezione di ceppi di meningococco, effettuando esperimenti di Slot blot con una sonda *gdhA*-specifico (Tabella 1). I ceppi appartenenti alle linee iper-virulente ET-5 (BL899, BL937, BF23, BZ169, H44/76 ed MC58) e IV-I (205900), un ceppo ET-5-correlato (BL857) ed altri tre ceppi non correlati (BF8960, BF8969 e BF43B) mostrano livelli di mRNA di *gdhA* circa 4 volte più alti rispetto alla maggior parte degli altri ceppi (Tabella 1).

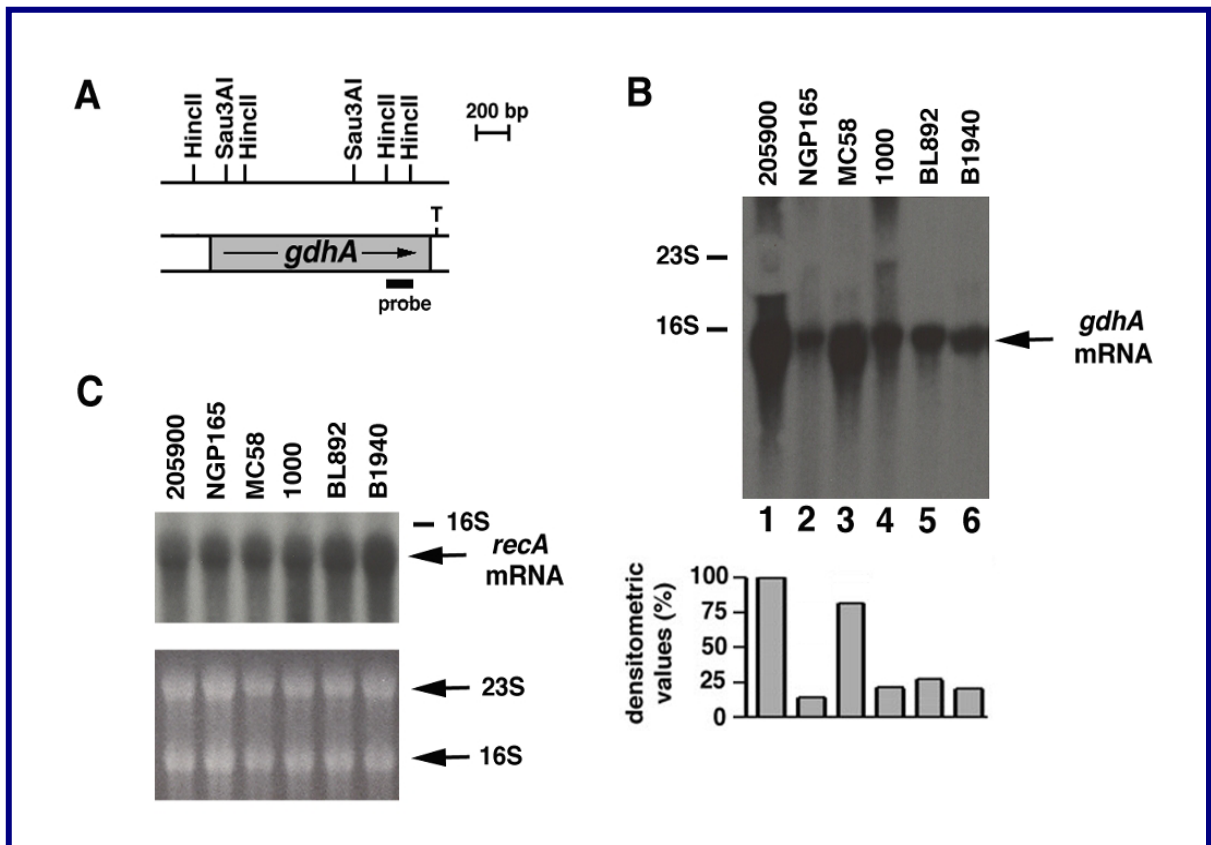


Figura 14. Analisi mediante Northern blot degli mRNA *gdhA*-specifici in isolati clinici di *N. meningitidis*.

A. Mappa fisica e genetica del gene *gdhA*. I siti di restrizione sono indicati nella mappa genetica. E', inoltre, mostrata la localizzazione del terminatore della trascrizione (T) Rho-indipendente bi-direzionale e quella del frammento di DNA (box nera) utilizzato come sonda *gdhA*-specifica.

B. Analisi mediante Northern blot degli mRNA *gdhA*-specifici. Gli RNA totali sono stati estratti dai ceppi 205900, NGP165, MC58, 1000, BL892 e B1940 (corsie 1-6) ed analizzati mediante Northern blot utilizzando una sonda *gdhA*-specifica (A). La freccia sulla destra indica il trascritto *gdhA*-specifico. Le barre sulla sinistra indicano la migrazione relativa degli RNA ribosomali. In basso è riportata l'analisi densitometrica del saggio di Northern blot. I livelli dell'mRNA di *gdhA* nei differenti ceppi, sono comparati con quello del ceppo 205900 assunto arbitrariamente pari al 100%.

C. Controlli dell'analisi per Northern blot. Gli RNA totali trasferiti su lo stesso filtro come in (B) sono stati ibridizzati ad un frammento di 400 bp, marcato con ^{32}P , utilizzato come sonda *recA*-specifico. La freccia sulla destra indica il trascritto *recA*-specifico; in basso è mostrata la corsa elettroforetica degli rRNA, le frecce sulla destra indicano la migrazione dell'RNA 23S e 16S.

Tabella 1. Livelli di mRNA ed alleli di *gdhA* in isolati clinici di *N. meningitidis*.

Ceppo	Sierogruppi e/o sierotipi ^a	Lineage ^b	Cmpione ^c clinico	Livelli di <i>gdhA</i> mRNA ^d	Alleli <i>gdhA</i> ^e	Fonte ^f
BF2	B	ET-37	NP	++	C	i.
BF3	B	ET-37	NP	++	C	i.
BF9	B	altra	NP	++	C	i.
BF13	B	altra	NP	++	C	i.
BL847	B:14:P1.12	Linea 3	CSF	++	C	ii.
BL851	B:4:P1.13	Linea 3	CSF	++	C	ii.
BL857	B:21:P1.7,16	altra	CSF	++++	B	ii.
BL858	B:15,21:P1.15	altra	CSF	++	C	ii.
BL859	B:4:P1.13	Linea 3	CSF	++	C	ii.
BS843	B:4:P1.13	Linea 3	BL	++	C	ii.
BS845	B:4:P1.13	Linea 3	BL	++	C	ii.
BS849	B:4:P1.13	Linea 3	BL	++	C	ii.
BL855	B	ET-37	CSF	++	C	ii.
B1940	B:NT:P1.3,6,15	altra	CSF	++	C	iii.
BL9513	B:4:P1.4	Linea 3	CSF/BL	++	C	iv.
BL892	B:4:P1.4	Linea 3	CSF	++	C	iv.
BL942	B:1:NST	Linea 3	CSF	++	C	iv.
BL911	B:NT:P1.9	altra	CSF	++	C	iv.
BL915	B:NT:P1.5	altra	CSF	++	C	iv.
BL951	B:NT:P1.1	Linea 3	CSF	++	C	iv.
BL899	B:4:P1.2,5	ET-5	CSF	++++	B	iv.
BL932	B:4:P1.1	altra	CSF	++	C	iv.
BL937	B:4:NST	ET-5	CSF	++++	B	iv.
BL947	B:1:NST	altra	CSF	++	C	iv.
BL897	B	altra	CSF	++	C	iv.
BF10	B	altra	NP	+++	D	v.
BF17	B	altra	NP	n.d.	n.d.	v.
BF18	B	altra	NP	+++	D	v.
BF21	B	altra	NP	+++	D	v.
BF65	B	altra	NP	++	C	v.
BF16	B	altra	NP	++	C	v.
BF23	B	ET-5	NP	++++	B	v.
BF40	B	ET-37	NP	++	C	v.
BF52	B	ET-37	NP	++	C	v.
BF8960	B	altra	NP	+++++	A	vi.
BF8961	B	altra	NP	++	C	vi.
BF8964	B	altra	NP	++	C	vi.
BF8969	B	altra	NP	+++++	A	vi.
BF9216	B	altra	NP	++	C	vi.
BF5425	B	altra	NP	++	C	vi.
BF32B	B	Linea 3	NP	++	C	vii.
BF37B	B	altra	NP	++	C	vii.
BF43B	B	altra	NP	+++++	A	vii.
BF6L	B	altra	NP	++	C	vii.
BF8L	B	altra	NP	++	C	vii.
BF57L	B	altra	NP	++	C	vii.
205900	A	IV-1	CSF/BL	+++++	A	viii.
93/4286	C	ET-37	CSF/BL	++	C	viii.
NGP165	B	ET-37	CSF/BL	++	C	viii.
BZ169	B	ET-5	CSF/BL	++++	B	viii.
H44/76	B	ET-5	CSF/BL	++++	B	viii.
MC58	B	ET-5	CSF/BL	++++	B	viii.
NGF26	B	altra	CSF/BL	++	C	viii.
1000	B	altra	CSF/BL	+++	D	viii.
NGE31	B	altra	CSF/BL	++	C	viii.
NGH15	B	altra	CSF/BL	++	C	viii.
ZF15	Z	altra	NP	n.d.	n.d.	v.
XL929	X	altra	CSF/BL	++	C	iv.
XF47A	X	altra	NP	++	C	v.
YL896	Y	altra	CSF	++	C	iv.
CF5C	C	altra	NP	++	C	v.

a. NT, non sierotipizzabile; NST, non sub-sierotipizzabile.

b. L'assegnazione degli isolati alle differenti linee ipervirulente è stata determinata attraverso analisi dei RFLP (Salvatore et al., 2001).

c. NP, nasofaringe; CSF, liquido cerebro-spinale; BL, sangue.

d. I livelli di mRNA di *gdhA* dei differenti ceppi sono stati comparati a quelli del ceppo 205900, arbitrariamente assunti uguali al 100%. Sono stati utilizzati i seguenti simboli: +++++ (80-100%); ++++ (60-80%); +++ (40-60%); ++ (20-40%); + (5-20%), n.d., non determinato.

e. Gli alleli A, B, C e D indicati in tabella sono stati individuati mediante PCR effettuata con gli oligonucleotidi *gdhA1* e *gdhR1*, utilizzati per amplificare la regione intercristica *gdhA-gdhR*.

f. i., II policlinico, Università di Napoli, IT; ii. Istituto Superiore di Sanità, Roma, IT; iii. Bayerische Julius-Maximilians Universität, Würzburg, Germany; iv. Institut Pasteur, Paris, FR. v. Hôpital d'Instruction des Armées, BREST NAVAL, FR; vi., Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées, Marseille Armées, FR; vii. Laboratory of Microbiology, Università di Lecce, IT; viii. IRIS, Chiron S.p.A, Siena, IT

Analisi della regione genomica di *gdhA* in isolati clinici di *N. meningitidis*

Utilizzando le sequenze nucleotidiche disponibili in banca dati del genoma di tre ceppi di *N. meningitidis*: MC58 (ET-5), Z2491 (IV-I) e FAM18 (ET-37), è stata costruita la mappa fisica e genetica della regione in cui mappa *gdhA* (Fig. 15). Gli allineamenti delle sequenze dimostrano che *gdhA* è altamente conservato tra i ceppi (>99% di identità; dati non mostrati), compresa una regione 5' non-codificante di 314 bp, presumibilmente contenente gli elementi promotori, ed una regione 3' non-codificante di 95 bp, contenente il probabile terminatore della trascrizione Rho-indipendente bi-direzionale (Fig. 15).

Nel ceppo MC58, immediatamente a valle di *gdhA*, è stato individuato un gene, indicato come *gdhR*, che codifica un regolatore trascrizionale appartenente alla subfamiglia FadR della famiglia GntR dei regolatori batterici *helix-turn-helix* (Rigali et al., 2002), trascritto in direzione opposta rispetto a *gdhA*. Nel ceppo Z2491, tra *gdhA* e *gdhR* è localizzato un elemento *nemis* (*neisserial miniature insertion sequence*), una sequenza pseudo-trasponibile tipica del genoma di *Neisseria*, appartenente alla classe 26L-27R (Mazzone et al., 2001); infine, nel ceppo FAM18 la regione intercistronica *gdhA-gdhR* contiene due piccole *orf* (*open reading frames*) a funzione sconosciuta, *orf1* (375 bp) e *orf2* (258 bp), orientate nella stessa direzione di *gdhA*, a valle delle quali mappa l'elemento *nemis*. Utilizzando il COGNITOR software fornito dalla NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/COG>) è risultato che *orf1* esibisce una debole omologia di sequenza con la proteina XkdD dell'elemento fago-like PBSX di *Bacillus subtilis* (identità 38%; positivo 52%, *gaps* 14%) e con i membri della famiglia della trasposasi IS30 (identità 24%; positivo 50%, *gaps* 20%). Inoltre, si è osservato che in tutti e tre i ceppi analizzati, il gene *gdhR* è, immediatamente, preceduto da un altro elemento *nemis* (Fig. 15).

Per identificare la presenza di eventuali elementi in *cis*- o fattori *trans*-agenti responsabili dell'espressione differenziale di *gdhA*, è stata analizzata la regione genomica *gdhA* in diversi

ceppi di meningococco. Sono stati disegnati due oligonucleotidi, *gdhA1* e *gdhR1* (Fig. 15) per amplificare la regione intercistronica *gdhA-gdhR* mediante reazione a catena della polimerasi (PCR). L'analisi ha evidenziato quattro classi di ampliconi, le cui lunghezze definivano quattro alleli: A (688 bp), B (534 bp), C (1322 bp), D (circa 3000 bp). I dati mostrati in Tabella 1, indicano una stretta correlazione tra gli alleli e l'espressione di *gdhA*, che risulta massima nei ceppi che portano gli alleli A o B e minima nei ceppi che portano gli alleli C o D.

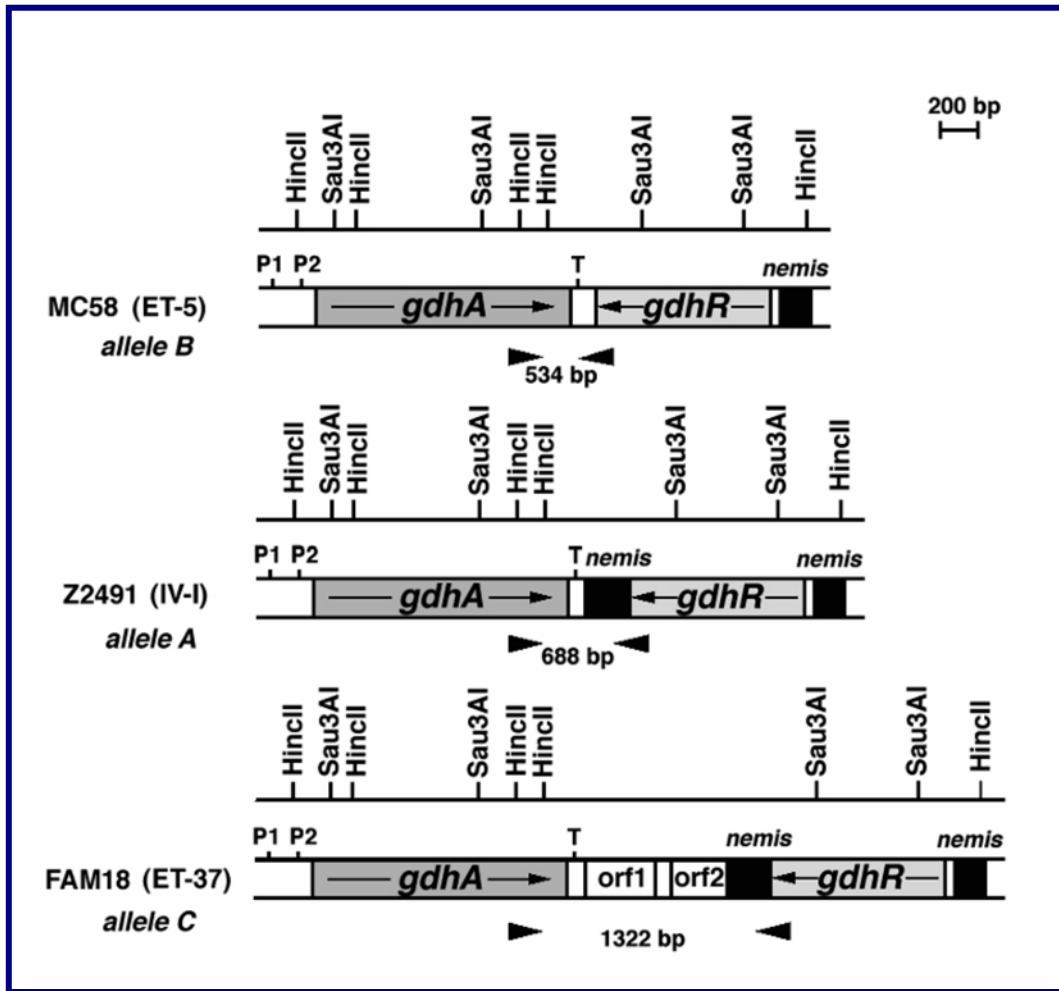


Figura 15. Struttura ed elementi regolatori della regione *gdhA-gdhR* in ceppi di meningococco appartenenti a diverse linee ipervirulente.

In figura è illustrata la mappa fisica e genetica della regione *gdhA-gdhR* in ceppi portanti l'allele A (ceppi IV-1), l'allele B (ceppi ET-5) e l'allele C (ceppi ET-37). Le mappe sono state costruite sulla base delle sequenze disponibili, nella banca dati dell'NCBI, dei ceppi MC58 (ET-5), FAM18 (ET-37) e Z2491 (IV-1). In figura è, inoltre, indicata la localizzazione delle regioni codificanti *gdhA* e *gdhR*, degli elementi regolatori rilevanti, inclusi i promotori *gdhA* P1 e *gdhA* P2, del terminatore della trascrizione (T) Rho-indipendente bifunzionale e delle sequenze *nemis*. Nei ceppi che portano l'allele C tra *gdhA* e *gdhR*, trascritti in direzione opposta, mappano due piccole ORFs, *orf1* e *orf2*. Le frecce indicano la posizione dei primers *gdhA1* e *gdhR1* utilizzati nelle reazioni di PCR per amplificare gli alleli A, B, C e D nei ceppi di meningococco. Le dimensioni dei prodotti di PCR, indicate tra le frecce, rivelano le classi alleliche della regione intercistronica *gdhA-gdhR*.

L'analisi delle varianti alleliche nella regione intercistronica *gdhA-gdhR*, in diversi ceppi di meningococco di sierogruppo A, B, e C, consente di ipotizzare una sua possibile evoluzione. L'organizzazione più ancestrale della regione *gdhA-gdhR*, sembra essere quella dei ceppi di *N. meningitidis* appartenenti al sierogruppo B, linea evolutiva ET-5 (allele B), ciò si deduce dalla presenza di un dinucleotide TA a valle del terminatore T, Rho-indipendente, sito di un possibile evento di pseudo-trasposizione dell'elemento *nemis*. Come conseguenza di tale evento si è verificata la duplicazione del dinucleotide (TA). Questi riarrangiamenti normalmente generano una sequenza TAta, fiancheggiante l'elemento *nemis*, che si riscontra nei ceppi di sierogruppo A, linea evolutiva IV-I (allele A). Infine, i ceppi di sierogruppo C, linea evolutiva ET-37 (allele C), mantengono inalterata la sequenza *nemis*, putativo sito bersaglio di un elemento mobile che ha portato le due ORFs, *orf1* e *orf2* (Fig. 16). L'inserzione dell'elemento mobile è, probabilmente, avvenuta nella sequenza TAta localizzata all'estremità sinistra dell'elemento *nemis*.

Inoltre, sono state effettuate analisi *in silico* per identificare putativi terminatori della trascrizione Rho-dipendenti, TTE (*Transcription Termination Elements*), nella regione intercistronica *gdhA-gdhR* dei ceppi analizzati. Utilizzando un *software* in grado di identificare terminatori Rho-dipendenti, è stata rivelata la presenza di tre TTEs, solo nel filamento antisenso di *orf1* e *orf2* nei ceppi portanti l'allele C. Tali sequenze sono caratterizzate da un elevato rapporto G:C e da una ridotta capacità di formare strutture secondarie a livello dell'RNA (Fig. 16).

Stabilità dell'mRNA di *gdhA* e caratterizzazione funzionale della regione promotore

I quattro ampliconi di *gdhA-gdhR* identificati, differiscono sostanzialmente alla regione 3' non codificante a valle di *gdhA*. Poiché tale regione può controllare l'espressione genica post-trascrizionale (Alifano et al., 1994), è stata determinata la stabilità dell'mRNA di *gdhA* nei ceppi di meningococco 205900, MC58, NGP165 e 1000, portanti rispettivamente gli alleli A, B, C e D.

Per valutare la stabilità degli mRNA di *gdhA*, i ceppi sono stati cresciuti fino alla tarda fase logaritmica, a circa 0.8 OD_{550nm}, in terreno complesso GC. E' stata, quindi, prelevata un' aliquota da utilizzare come tempo zero, successivamente, è stata aggiunta rifampicina (36 µg/ml) alla restante coltura batterica, per bloccare l'inizio della trascrizione, e sono state prelevate aliquote di eguale volume a 0, 15, 45 e 90 secondi dall'aggiunta dell'antibiotico. L'RNA totale è stato estratto, e 10 µg sono stati analizzati mediante Northern blot utilizzando una sonda *gdhA*-specifico. I risultati di questo esperimento, indicano che l'espressione differenziale di *gdhA* non è dovuta ad una diversa stabilità dell'mRNA, in quanto essa è paragonabile in tutti e quattro i ceppi analizzati, nonostante presentino una differente espressione del gene. L'analisi densitometrica, infatti, misura una emivita molto breve, di circa 15 secondi in tutti i ceppi presi in esame, ciò indica che la regolazione genica di *gdhA*, non avviene mediante un meccanismo post-trascrizionale (Fig.17).

Poiché la differente espressione del gene può essere associata ad una attività differenziale del promotore (o dei promotori) nei diversi ceppi di meningococco esaminati, abbiamo analizzato la regione del promotore di *gdhA* mediante un esperimento di Primer extension (Fig. 18).

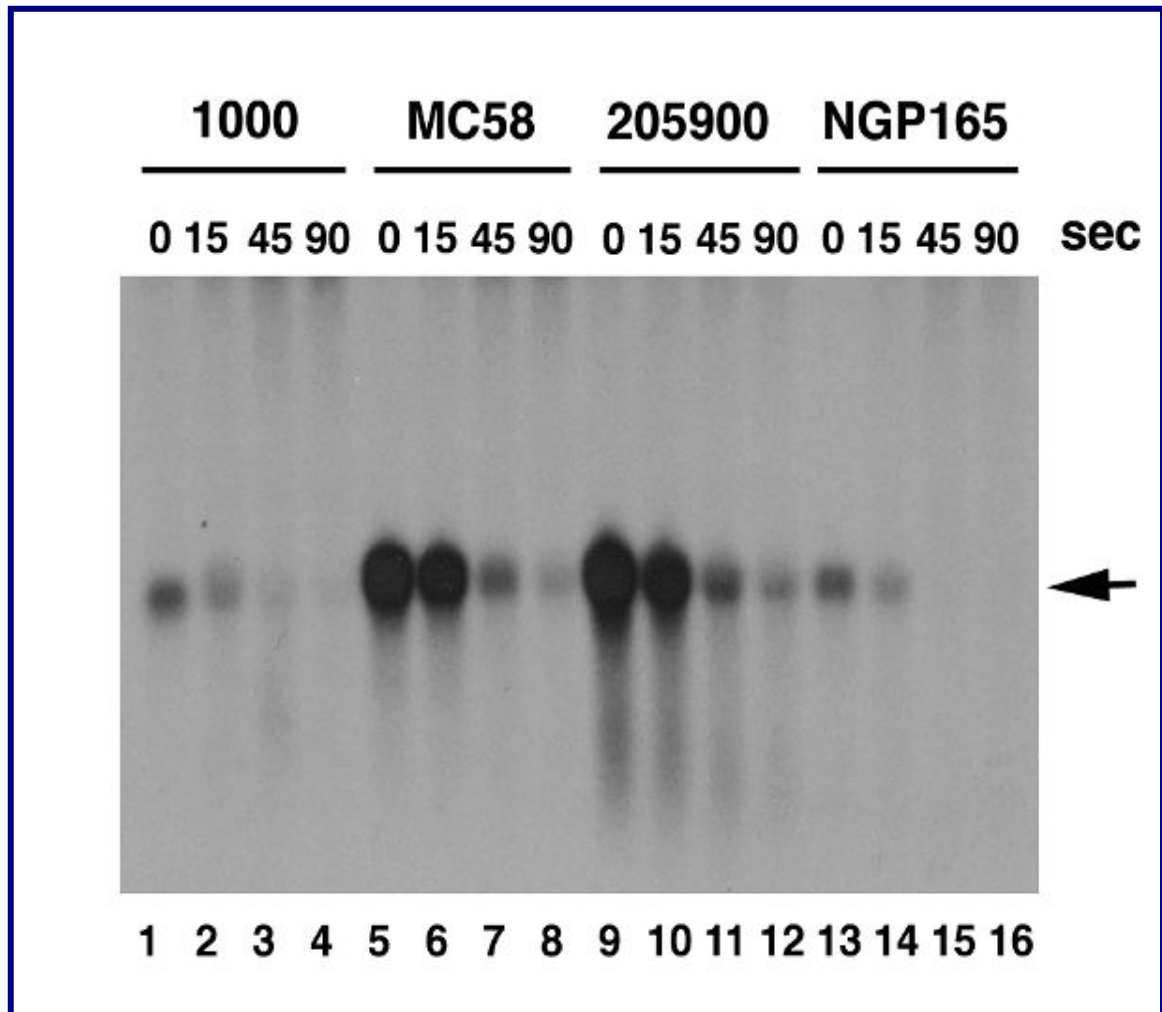


Figura 17. Analisi mediante Northern blot della stabilità dell'mRNA di *gdhA* in ceppi di *N. meningitidis*.

I ceppi 1000 (corsie 1-4), MC58 (corsie 5-8), 205900 (corsie 9-12) ed NGP165 (corsie 13-16), indicati in alto in figura, sono stati cresciuti fino alla fase logaritmica tardiva. La crescita è stata arrestata 0, 15, 45, 90 secondi dopo l'aggiunta di rifampicina. Gli RNA totali sono stati estratti ed analizzati mediante Northern blot utilizzando la sonda *gdhA*-specificata indicata in Fig. 14A. La freccia sulla destra indica l'mRNA specifico di *gdhA*.

L'analisi ha rivelato differenze tra i ceppi analizzati: i ceppi MC58 e 205900 mostrano lo stesso *pattern* di trascrizione, consistente di un trascritto più abbondante che parte dal presunto promotore *gdhA* P2, di un trascritto meno abbondante, ma più lungo a partire dal presunto promotore *gdhA* P1, e di 5 trascritti addizionali, indicati con Pr1-Pr5, di minor peso molecolare (Fig. 18A, corsie 5 e 6, rispettivamente). L'analisi della sequenza nucleotidica della regione del promotore di *gdhA* rivela anche la presenza di sequenze esameriche, molto simili alle sequenze degli elementi consenso -10 e -35 dei promotori vegetativi controllati dal fattore σ^{70} , a monte dei siti di inizio della trascrizione dei promotori *gdhA* P2 e *gdhA* P1. Dall'analisi della sequenza nucleotidica è risultata, anche, la presenza di sequenze ripetute di adenina, localizzate tra gli elementi -10 e -35 di entrambi i presunti promotori (6 adenine in P1 e 7 adenine in P2). Simili sequenze omopolimeriche sono state ritrovate nella regione compresa tra gli elementi -10 e -35 di numerosi promotori di geni implicati nella patogenesi meningococcica (Saunders et al., 2000). L'errato appaiamento delle sequenze nucleotidiche conseguente ad uno "scivolamento" dei filamenti, può causare una variazione del numero di queste unità ripetute, influenzando la forza del promotore, a seguito dell'alterazione dello spazio tra gli importanti domini strutturali (Sarkari et al., 1994; van der Ende et al., 1995). I nostri risultati sono indicativi dell'esistenza di due promotori, *gdhA* P1 e *gdhA* P2 a monte di *gdhA*, come previsto dall'analisi *in silico* utilizzando il *Neural Network Promoter Prediction database* (www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html).

Le quantità del trascritto P2 e dei trascritti a basso peso molecolare Pr1-Pr5 sono, invece, drammaticamente ridotte nel ceppo NGP165, mentre la quantità del trascritto P1 non presenta variazioni (Fig 18A, corsia 7). Tali risultati suggeriscono che i trascritti Pr1-Pr5 potrebbero essere dei prodotti derivati dal *processing* del trascritto nativo che origina dal promotore P2, e ciò, è coerente con l'ipotesi che bassi livelli di mRNA di *gdhA* possono essere dovuti alla ridotta attività di *gdhA* P2 nel ceppo NGP165 (allele C). I risultati di esperimenti di Slot blot, effettuati utilizzando gli oligonucleotidi *gdhA*p1 e *gdhA*p2, marcati all'estremità 5'-terminale,

come sonde specifiche per i trascritti di *gdhA* che si generano a partire dal promotore P1 o da P1+P2 (Fig. 18B), confermano che l'attività del promotore *gdhA* P2 è fortemente ridotta nel ceppo NGP165, come pure in tutti i ceppi con l'allele C o D (dati non mostrati). Poiché la sequenza nucleotidica della regione contenente *gdhA* P1-*gdhA* P2 e la lunghezza delle sequenze ripetute di adenina sono identiche in tutti i ceppi, indipendentemente dagli alleli, è stato dedotto che fattori *trans*-agenti potrebbero essere responsabili dell'attività differenziale di *gdhA* P2 in ceppi di *N. meningitidis*.

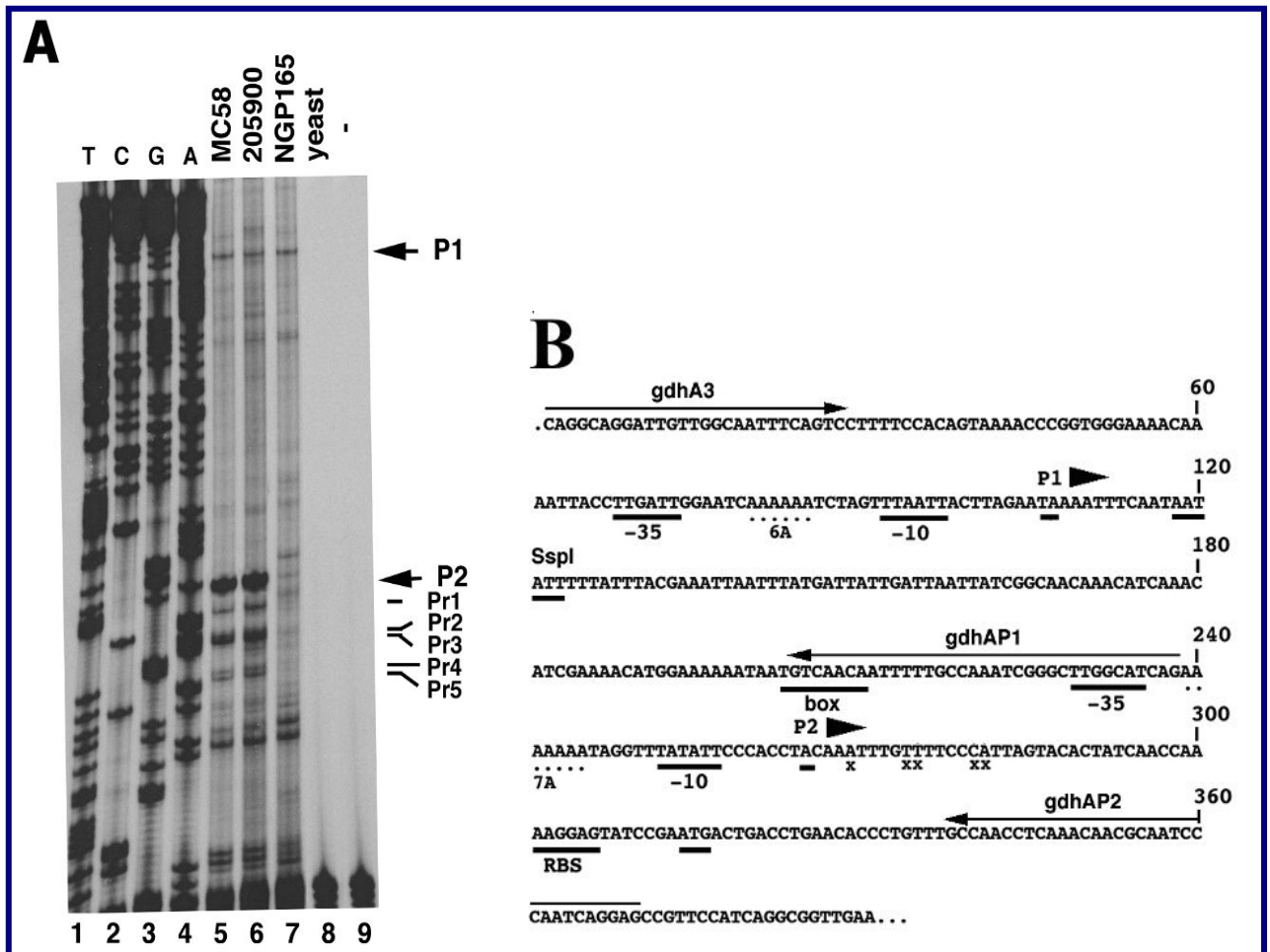


Figura 18. Analisi della regione promotore di *gdhA* in ceppi di *N. meningitidis* con espressione differenziale del gene.

A. Analisi mediante Primer extension della regione promotore di *gdhA* nei ceppi: MC58 (corsia 5), 205900 (corsia 6), NGP165 (corsia 7) e in lievito (corsia 8). Le dimensioni dei prodotti delle reazioni di Primer extension sono state determinate facendo correre in parallelo la reazione di sequenziamento (corsie 1-4) della regione del promotore di MC58, utilizzando *gdhAp2* come *primer*. La migrazione relativa dei prodotti di Primer extension ottenuti a partire dai promotori P1 e P2 (freccie) e dei possibili prodotti di processamento (barre) è indicata sulla destra.

B. Sequenza nucleotidica e caratteristiche rilevanti della regione promotore di *gdhA*. La sequenza riportata deriva dal ceppo MC58, disponibile in banca dati. Le frecce indicano i siti di inizio dell'mRNA dai promotori *gdhA* P1 e P2. In figura sono sottolineati: i presunti elementi, -35, -10 e +1 dei promotori *gdhA* P1 e *gdhA* P2; il sito di legame del ribosoma (RBS); il codone di inizio della trascrizione ATG di *gdhA* ed il sito *SspI* usato per generare la sonda *gdhA* P2-specifica per gli esperimenti di *mobility shift* (Fig. 24B). Caratteristiche aggiuntive sono: il sito palindromico 5'-TGTcaACA-3' (sottolineato); le sequenze ripetute di adenina tra i domini -10 e -35 di *gdhA* P1 e *gdhA* P2 (puntini); i *primers* *gdhAp1*, *gdhAp2* e *gdhA3*.

Identificazione di un regolatore trascrizionale dell'espressione di *gdhA*

La presenza di *orf1* e *orf2* tra *gdhA* e *gdhR* nei ceppi caratterizzati dall'allele C, ci ha condotto alla iniziale ipotesi che tali ORFs potessero essere implicate nella repressione dell'attività di *gdhA* P2. I risultati di un test di complementazione hanno escluso però tale ipotesi. Il test è stato eseguito trasformando il ceppo MC58 con il costrutto integrativo pNLE-*orf1.2*, un derivato del vettore pNLE1 contenente la regione *orf1-orf2* del ceppo NGP165. Il vettore ricombinante è stato ingegnerizzato per l'integrazione nel locus *leuS* (*leucyl-tRNA Synthetase*) (Salvatore et al., 2000). L'analisi di Northern blot non rivela differenze tra il ceppo MC58 parentale ed il ceppo congenico (dati non mostrati), escludendo un effetto *trans*-agente di *orf1-orf2* sull'espressione di *gdhA*. E' stato quindi, indagato un eventuale effetto *cis*-agente della regione di DNA *orf1-orf2* sull'espressione di *gdhR*, un buon candidato come gene regolatore di *gdhA*. Il risultato di un esperimento di Northern blot, eseguito crescendo i ceppi fino alla tarda fase logaritmica (0.8 OD_{550nm}) in mezzo complesso GC ed utilizzando una sonda *gdhR*-specificata, è coerente con tale ipotesi (Fig. 19A e 19B). Trascritti *gdhR*-specifici sono osservabili nei ceppi 205900 (Fig. 19B, corsia 3) ed MC58 (Fig. 19B, corsia 1). Le dimensioni di questi trascritti, 1150 nt in 205900, e 1000 nt in MC58, suggeriscono che essi originano dall'elemento *nemis* che precede il gene *gdhR*, in tutti i ceppi analizzati, e terminano in corrispondenza del terminatore della trascrizione Rho-indipendente bidirezionale a valle di *gdhA*. La trascrizione a partire dagli elementi *nemis* è un fenomeno descritto nelle *Neisseriae*, ed è stato documentato in altri geni meningococcici, incluso *uvrB* (Black et al., 1995), *drg* (Cantalupo et al., 2001) e IS1106Tip (Salvatore et al., 2001), sebbene questi elementi sono spesso coinvolti nel processamento dell'RNA (Mazzone et al., 2001; De Gregorio et al., 2002).

Nei ceppi NGP165 (Fig. 19B, corsia 4) e B1940 (Fig. 19B, corsia 5) che portano l'allele C, o nel ceppo 1000 (Fig. 19B, corsia 2) che porta l'allele D, la quantità dei trascritti *gdhR*-

specifici risulta al di sotto della soglia rilevata mediante Northern blot. Questo risultato dimostra uno stretto legame tra l'espressione di *gdhR* e di *gdhA*, suggerendo che *gdhR* possa essere un regolatore positivo per l'espressione di *gdhA*.

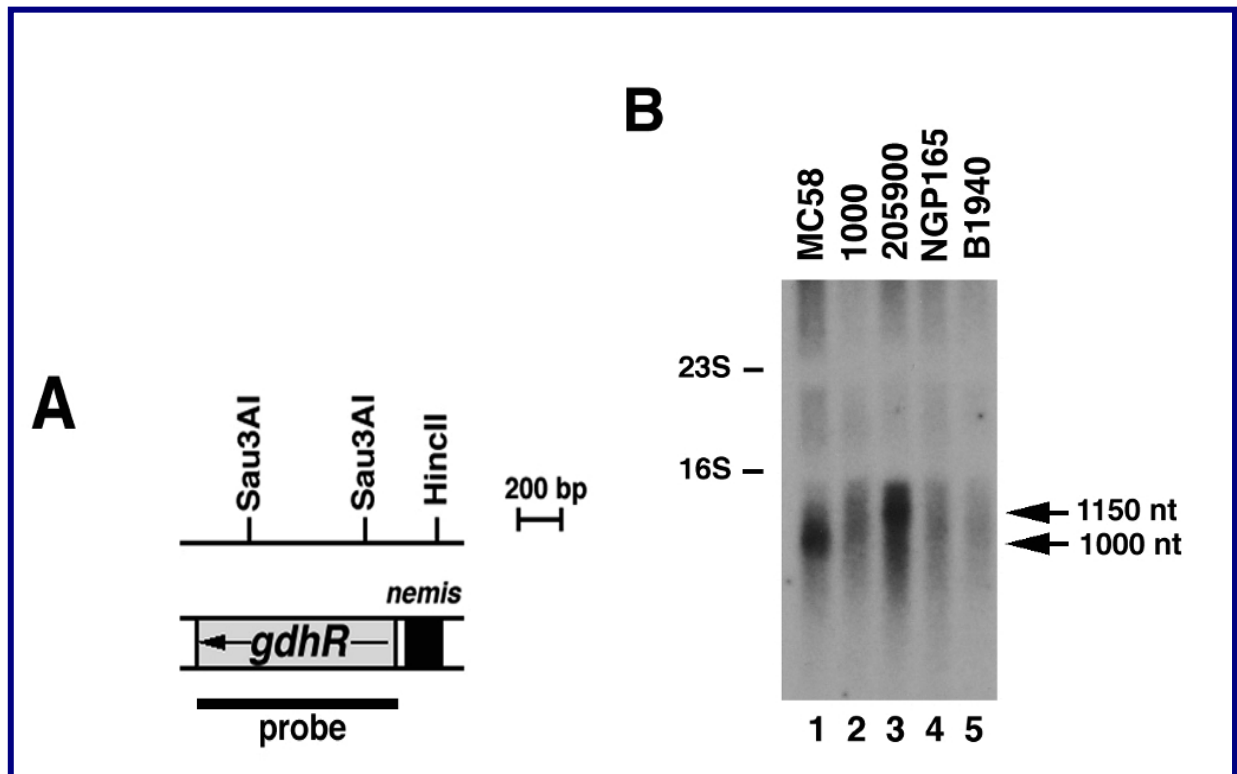


Figura 19. Analisi mediante Northern blot dei trascritti del gene *gdhR* in isolati clinici di *N. meningitidis*.

A. Mappa fisica e genetica del gene *gdhR*. I siti di restrizione sono indicati nella mappa genetica. E', anche, indicata la localizzazione del frammento di DNA (barra) utilizzato come sonda nell'esperimento di Northern blot (B).

B. Analisi mediante Northern blot. Gli RNA totali sono stati estratti dai ceppi MC58, 1000, 205900, NGP165 e B1940 (corsie 1-5, rispettivamente) ed analizzati mediante Northern blot utilizzando il frammento di 799 bp mostrato in (A). Le frecce sulla destra indicano i trascritti *gdhA*-specifici e le loro dimensioni dedotte sulla base della migrazione relativa degli RNA ribosomali (barre sulla sinistra).

Effetto del *knock-out* di *gdhR* sulla trascrizione di *gdhA*

Per ottenere un'evidenza diretta del ruolo di GdhR sulla trascrizione di *gdhA*, *gdhR* è stato inattivato inserzionalmente nel ceppo MC58 utilizzando il vettore pDE Δ gdhR (Fig. 20A). Analisi di Southern blot hanno confermato l'inserzione di una cassetta di resistenza all'eritromicina, utilizzato come marcatore selettivo per l'isolamento dei trasformanti, mediante un singolo evento di *crossing-over* in *gdhR*. Come risultato dell'evento di ricombinazione, due frammenti di DNA *Hinc*II delle dimensioni attese, di 1042 bp e di 733 bp, sono osservabili, utilizzando una sonda *gdhR*-specific, nei ceppi trasformati MC58 Ω gdhR1, MC58 Ω gdhR2, MC58 Ω gdhR3 (Fig 20B, corsie da 2 a 4) al posto del frammento *Hinc*II di 1322 bp del ceppo parentale MC58 (Fig 20B, corsia 1).

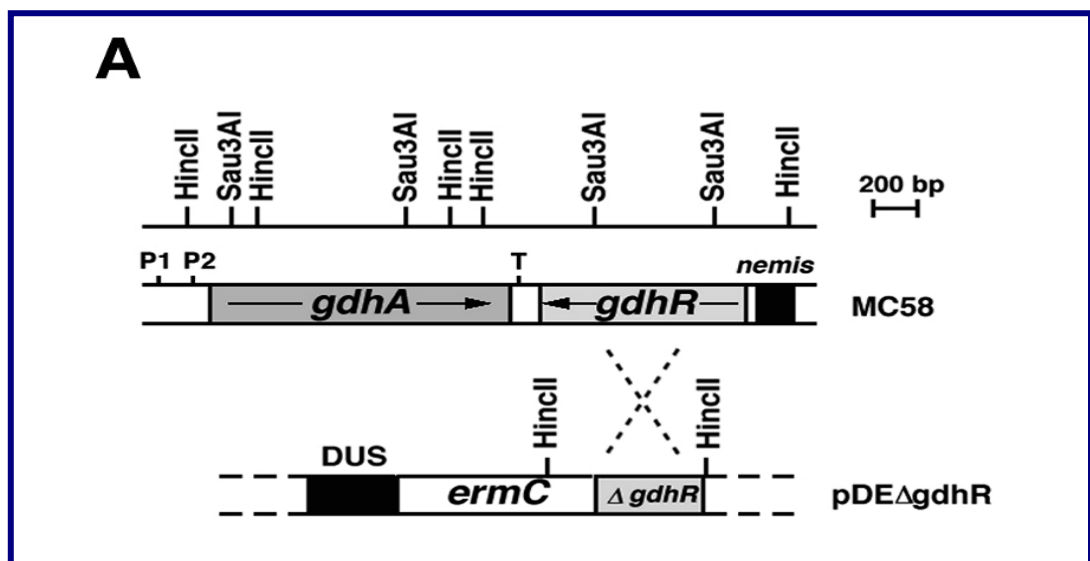
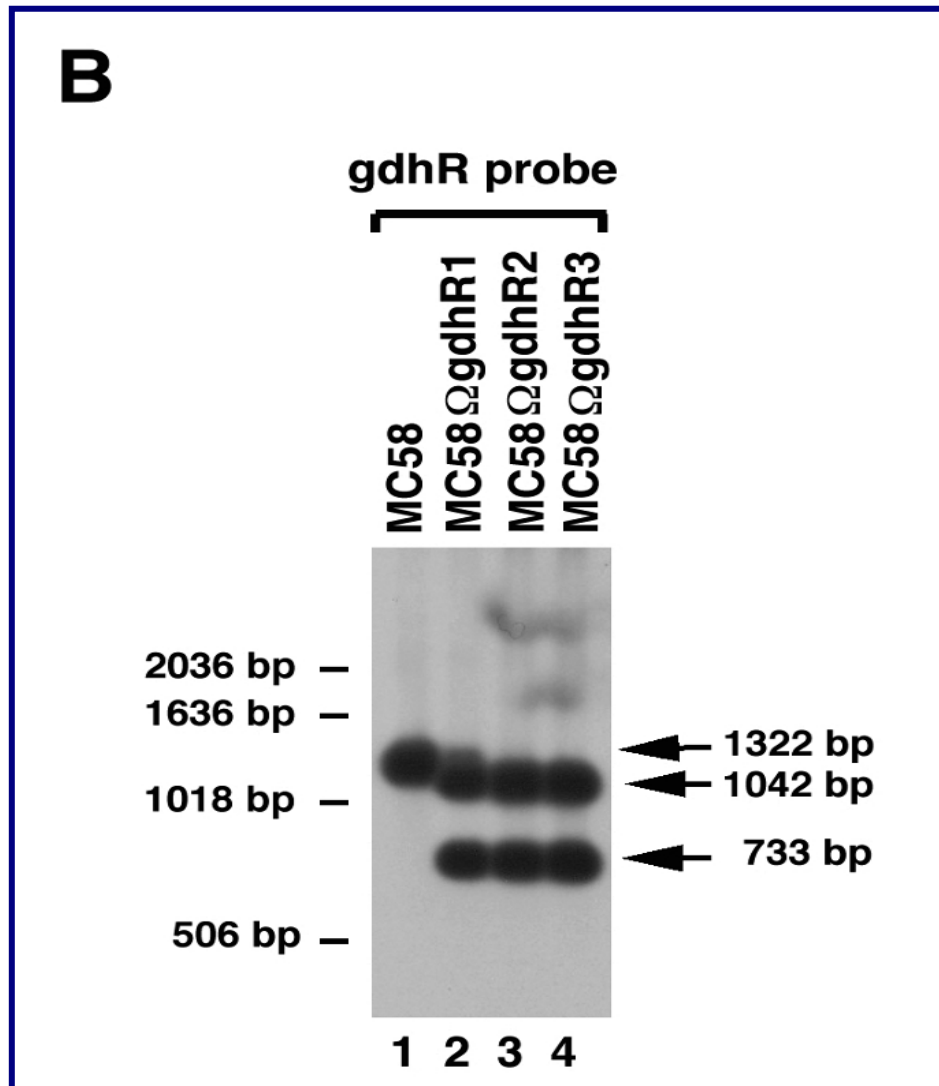


Figura 20. Knock-out di *gdhR* nel ceppo MC58 mediante un singolo evento di *crossing-over*.

A. Procedura sperimentale per la delezione di *gdhR* mediante un singolo evento di *crossing-over*. Mappa fisica e genetica della regione *gdhA-gdhR* di MC58. In basso è indicata la mappa genetica del plasmide pDE Δ gdhR, i determinanti genetici del vettore sono: i) *ermC*, gene per l'eritromicina-resistenza; ii) Δ *gdhR*, un frammento *Sau*3AI di 540 bp, corrispondente alla regione centrale di *gdhR*; iii) un frammento DUS, richiesto per un efficiente *uptake* del DNA durante la trasformazione.



B. Esperimento di Southern blot che dimostra l'avvenuta inattivazione di *gdhR*. Il DNA cromosomale è stato estratto dal ceppo parentale MC58 (corsia 1) e da tre cloni derivati, MC58 Ω gdhR1, MC58 Ω gdhR2, ed MC58 Ω gdhR3 (corsie 2-4) ottenuti dalla trasformazione con il plasmide pDE Δ gdhR. I DNA sono stati analizzati mediante Southern blot utilizzando la sonda *gdhR*-specificata indicata in Fig. 19A. Le frecce sulla destra indicano i frammenti *gdhR*-specifici le cui dimensioni sono state dedotte sulla base della migrazione relativa di una scala di pesi molecolari noti (barre sulla sinistra).

Al fine di valutare gli effetti del *knock-out* di *gdhR* sull'espressione di *gdhA*, i livelli di mRNA di *gdhA* sono stati monitorati durante la crescita (arrestata a 0.6, 0.8 e 1.0 OD_{550nm}) di MC58 e del congenico MC58Ω*gdhR*1 nel mezzo complesso GC (Fig. 21A). Il tasso di crescita di MC58Ω*gdhR*1 (tempo di generazione 42 minuti), in questo tipo di terreno, è circa il 15% più basso rispetto a quello di MC58 (tempo di generazione 35 minuti). I risultati dell'esperimento di Northern blot dimostrano che le quantità di mRNA di *gdhA* aumentano fortemente (più di 4 volte) durante la fase tardiva della crescita logaritmica in MC58 (Fig. 21A, corsie 1-3). In contrasto, l'espressione di *gdhR* è essenzialmente costitutiva (dati non mostrati). L'inattivazione di *gdhR* risulta in un marcato decremento dell'espressione di *gdhA*, non più inducibile durante la fase logaritmica tardiva (Fig. 21A, corsie 4-6).

Gli RNA totali estratti dal ceppo MC58 e dal congenico MC58Ω*gdhR*1 sono stati analizzati, anche, mediante Slot blot utilizzando sonde costruite per distinguere i trascritti *gdhA* P1-specifici dai trascritti *gdhA* P1+P2-specifici. I risultati degli esperimenti indicano chiaramente che l'attività del promotore *gdhA* P2 è notevolmente ridotta solo nel ceppo congenico MC58Ω*gdhR*1 (Fig. 21B).

Per confermare ulteriormente, che l'espressione di *gdhA* è ridotta nel clone *knock-out* MC58Ω*gdhR*1 ed è influenzata dalla fase di crescita, è stato allestito un saggio per stimare l'attività dell'enzima L-glutammato deidrogenasi, GdhA. A tale scopo, i ceppi MC58 e MC58Ω*gdhR*1 sono stati cresciuti, in terreno complesso GC, fino alla tarda fase logaritmica. La crescita è stata arrestata a 0.8, 1.0 e 1.2 OD_{550nm} e le cellule sono state sonicate, in modo da ottenere l'estratto crudo (S30) da utilizzare nella reazione enzimatica.

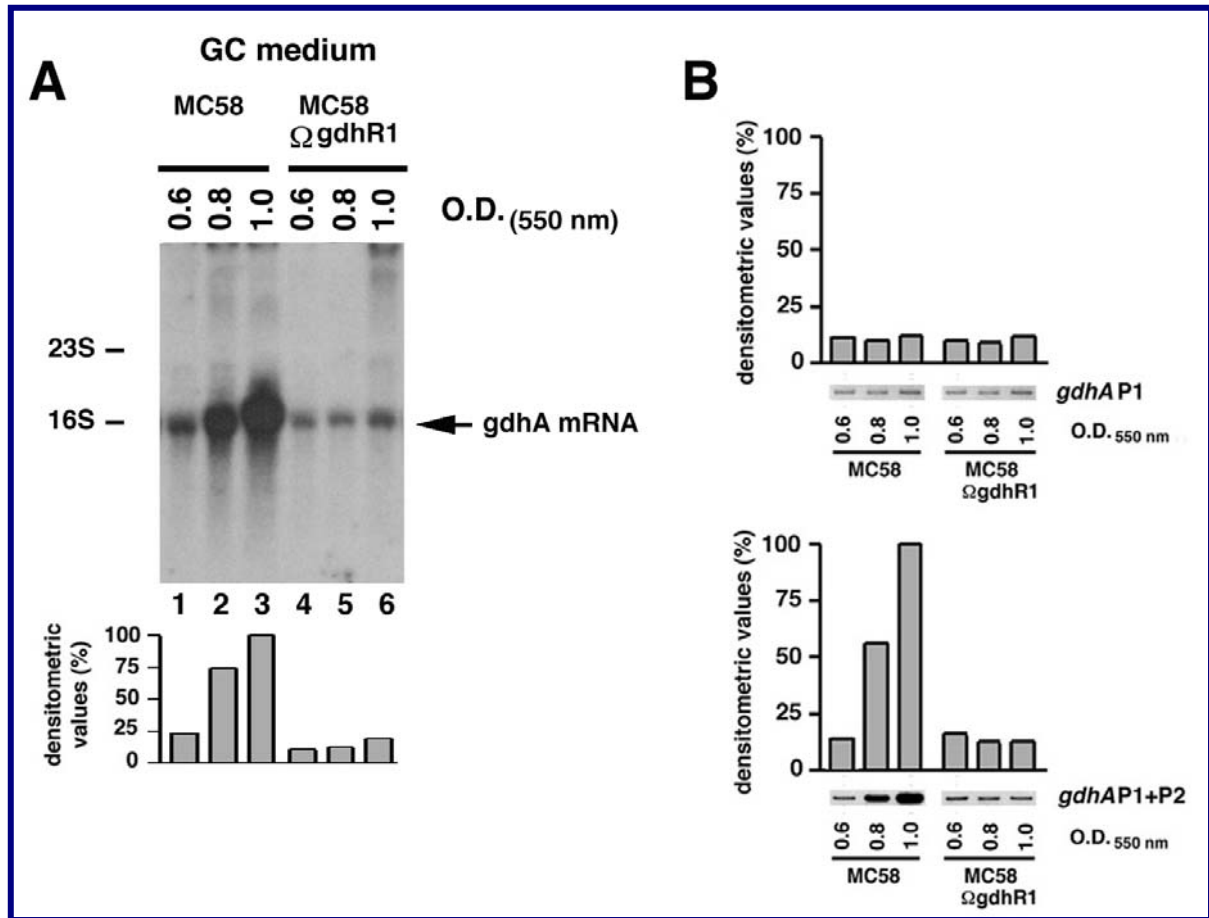


Figura 21. Effetto del *knock-out* di *gdhR* sulla fase di crescita.

A. Analisi mediante Northern blot dei trascritti di *gdhA* nei ceppi congenici MC58 (corsie 1-3) ed MC58 Ω gdhR1 (corsie 4-6) cresciuti in terreno complesso GC. La crescita è stata arrestata come indicato a 0.6, 0.8 ed 1.0 OD_{550nm}. Gli RNA totali sono stati estratti ed analizzati mediante Northern blot utilizzando la sonda *gdhA*-specifica come in Fig. 14B. In basso è mostrata l'analisi densitometrica dell'esperimento di Northern blot. I livelli di mRNA di *gdhA* dei differenti ceppi sono comparati a quelli di MC58 cresciuto a 1.0 OD_{550nm}, arbitrariamente assunti pari a 100 %.

B. Analisi mediante Slot blot dell'attività dei promotori *gdhA* P1 e *gdhA* P2. I ceppi MC58 e MC58 Ω gdhR1 sono stati cresciuti come in (A). Gli RNA totali sono stati estratti ed analizzati mediante Slot blot, utilizzando come sonde gli oligonucleotidi disegnati per evidenziare i trascritti di *gdhA* P1-specifici e P1+P2-specifici. Le analisi quantitative dell'intensità delle bande sono state riportate in istogrammi. I valori densitometrici sono comparati a quelli ottenuti con la sonda P1+P2-specifica in MC58 cresciuto a 1.0 OD_{550nm}, arbitrariamente assunti pari a 100 %.

Nella reazione catalizzata dall'enzima GdhA il cofattore NADPH si ossida determinando un aumento dell'assorbanza a 340nm, facilmente rilevabile mediante lettura allo spettrofotometro a seguito dell'aggiunta dell'estratto crudo (S30) ad una soluzione contenente acido 2-oxoglutarico, NADPH ed NH₄Cl. L'attività dell'enzima GdhA è complessivamente ridotta in MC58ΩgdhR1 rispetto a MC58 ed aumenta fortemente in tarda fase logaritmica solo nel ceppo parentale MC58.

L'espressione di *gdhA* è stata anche analizzata in MC58 ed MC58ΩgdhR1 cresciuti fino alla fase logaritmica tardiva in mezzo chimicamente definito MCDA (Materiali e Metodi) supplementato con glutammato, arginina, glicina, serina e cisteina, utilizzando il lattato (MCDA-lattato) o il glucosio (MCDA-glucosio) come sorgente di carbonio (energia). I tempi di generazione di MC58 e di MC58ΩgdhR1 sono, rispettivamente, 42 minuti e 75 minuti in MCDA-glucosio, e 42 minuti e 60 minuti in MCDA-lattato (Fig. 22C). I risultati dell'analisi di Northern blot (Fig. 22B) dimostrano che l'espressione di *gdhA* è regolata dalla sorgente di energia. In MC58 i livelli di mRNA di *gdhA* sono circa tre volte più alti in MCDA-glucosio (Fig. 22B, corsia 2) che in MCDA-lattato (Fig. 22B, corsia 1). In MC58ΩgdhR1 le quantità di trascritti di *gdhA* sono drammaticamente ridotte e non sono rilevabili differenze tra i due mezzi (Fig. 22B, corsie 3 e 4). I dati quantitativi sono riportati mediante istogrammi..

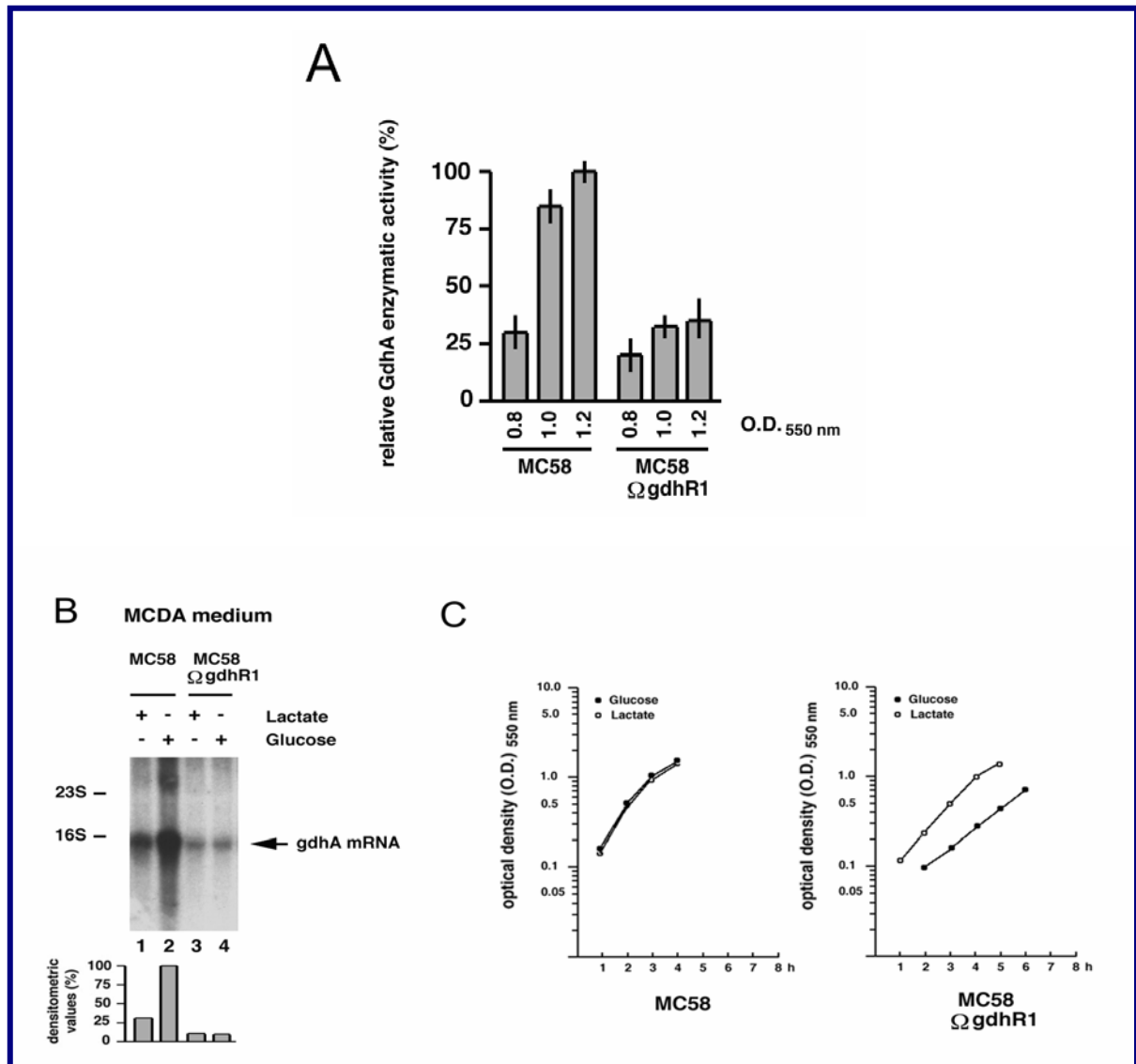


Figura 22. Effetto del *knock-out* di *gdhR* sulla regolazione di *gdhA* in relazione alla sorgente di carbonio e sull'attività enzimatica di GdhA.

A. Attività della NADP-GDH nei ceppi MC58 e MC58ΩgdhR1. Le attività della NADP-GDH sono state misurate spettrofotometricamente, registrando il tasso di ossidazione dell' NADPH. Le attività della NADP-GDH dei differenti ceppi sono comparate a quelle di MC58 cresciuto a 1.2 OD_{550nm} (868 nm di NADPH ossidato [37°C, pH 7.6]/min/mg proteina), arbitrariamente assunte pari a 100%.

B. Analisi mediante Northern blot dei trascritti di *gdhA* nei ceppi MC58 ed MC58ΩgdhR1 cresciuti in mezzo chimicamente definito. MC58 (corsie 1-2) ed MC58ΩgdhR1 (corsie 3-4) sono stati cresciuti in MCDA, utilizzando lattato o glucosio come sorgente di carbonio, come indicato in alto in figura. Gli RNA totali sono stati estratti ed analizzati mediante Northern blot utilizzando la sonda *gdhA*-specifico come in Fig. 19B. In basso è riportata l'analisi densitometrica dell'esperimento di Northern blot. I livelli di mRNA di *gdhA* dei diversi ceppi sono comparati a quelli di MC58 cresciuto in MCDA-glucosio, arbitrariamente assunti pari a 100 %.

C. Curve di crescita di MC58 ed MC58ΩgdhR1 cresciuti in MCDA-lattato ed MCDA-glucosio.

Complementazione di *gdhR* nel mutante difettivo

Per escludere la possibilità che gli effetti dell'inattivazione di *gdhR* sulla trascrizione di *gdhA* fossero il risultato della inattivazione di alcuni elementi *cis*-agenti, indipendentemente dalla perdita dell'espressione di *gdhR*, è stato allestito un saggio di complementazione.

Il gene *gdhR* e gli elementi regolatori fiancheggianti, inclusa la putativa regione del promotore (con gli elementi *nemis*), ed il terminatore trascrizionale, sono stati clonati nel vettore pACNL1, dando origine al plasmide ricombinante pACgdhR. Quest'ultimo è caratterizzato da una cassetta di resistenza al cloramfenicolo ed è stato ingegnerizzato per l'integrazione nel locus *leuS-drg* (*leucyl-tRNA Synthetase-dam replacing gene*) del ceppo congenico MC58ΩgdhR1 (Fig. 23A).

Analisi di Southern blot (Fig. 23B), utilizzando un *probe drg*-specifico, hanno evidenziato la corretta inserzione del vettore pACgdhR nella regione *leuS-drg* in due cloni trasformati. L'inserzione ha, infatti, generato un frammento *Eco*RI di 4635 bp solo nel clone MC58ΩgdhR1/pACgdhR (Fig. 23B, corsie 2 e 3), mentre nel ceppo parentale è presente un frammento di 6583 bp (Fig. 23B, corsie 1-3). Sono stati, in seguito, effettuati saggi di Northern blot per analizzare l'espressione di *gdhA* nel clone complementato MC58ΩgdhR1/pACgdhR; gli RNA totali sono stati estratti da cellule in iniziale e tardiva fase di crescita logaritmica in terreno complesso GC. I dati del Northern blot indicano che la regolazione dell'espressione di *gdhA*, dipendente dalla fase di crescita, è completamente ripristinata solo nel clone complementato MC58ΩgdhR1/pACgdhR, confermando il ruolo regolatore di *gdhR* sulla trascrizione di *gdhA*.

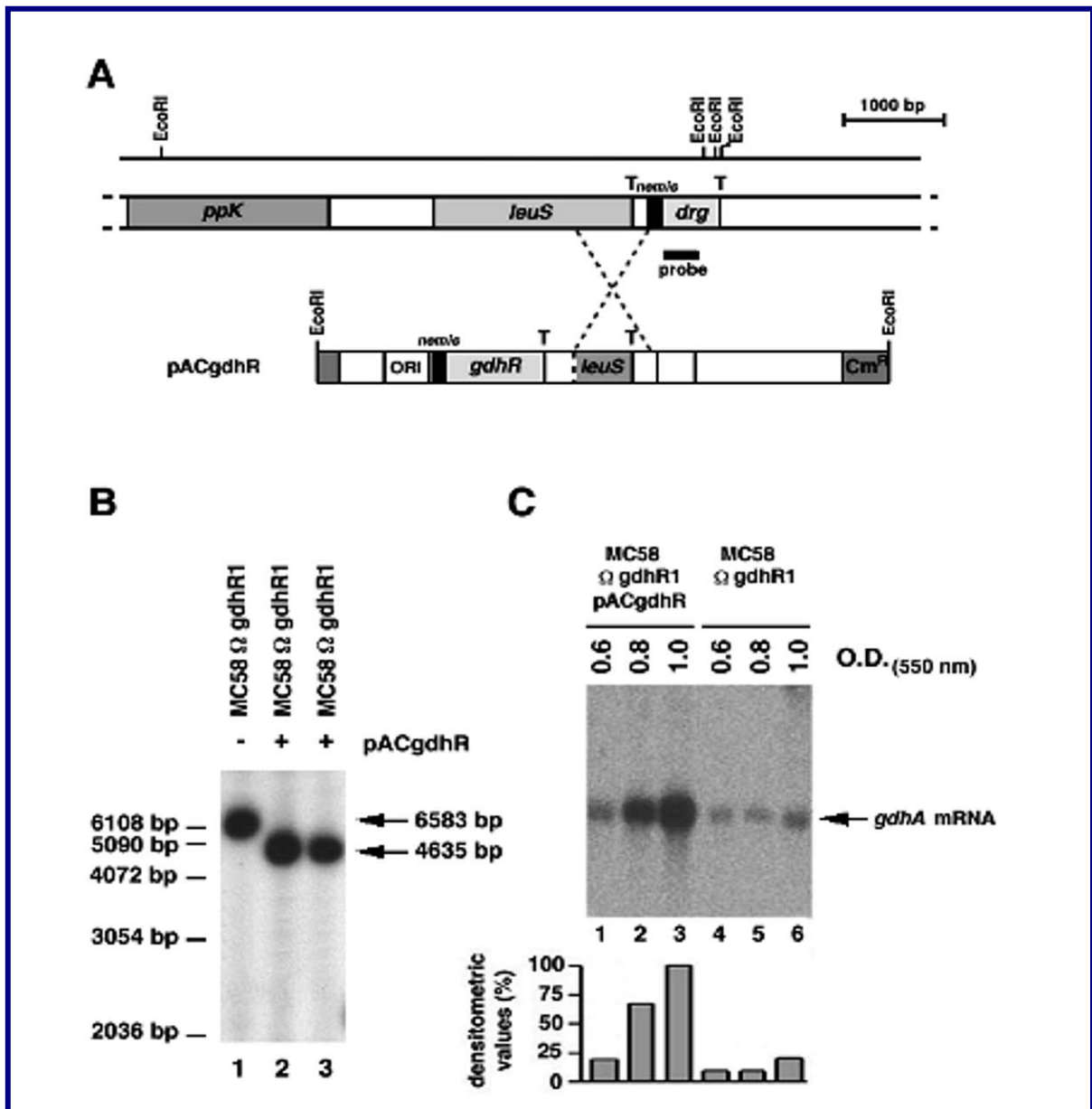


Figura 23. Complementazione del mutante *gdhR*-difettivo.

A: Disegno sperimentale per la complementazione del mutante *gdhR*-difettivo. La mappa fisica e genetica della regione *ppk-leuS-drg* (*polyphosphate kinase - leucyl-tRNA Synthetase - dam replacing gene*) del ceppo MC58, è indicata sopra la mappa del plasmide *pACgdhR*.

B: Saggio di Southern blot che mostra l'integrazione di *pACgdhR* nel locus *leuS-drg*. Il DNA cromosomale è stato estratto dal ceppo parentale MC58 Ω *gdhR1* (corsia 1) e dai cloni derivati (corsie 2 e 3), trasformati con *pACgdhR*, ed analizzato per Southern blot utilizzando il probe *drg*-specifico mostrato in (A). Le frecce indicano le lunghezze dei frammenti identificati, dedotte sulla base della migrazione relativa del marcatore di peso molecolare (barre).

C: Analisi mediante Northern blot dell'espressione di *gdhA* in un ceppo *gdhR*-difettivo complementato. I ceppi MC58 Ω *gdhR1* (corsie 4-6) ed MC58 Ω *gdhR1*/*pACgdhR* (corsie 1-3), sono stati cresciuti fino a 0.6, 0.8, 1.0 OD_{550nm} come indicato. Gli RNA totali sono stati estratti ed analizzati mediante Northern blot utilizzando il probe *gdhA*-specifico. In figura è mostrata l'analisi densitometrica del Northern blot. I livelli dell'mRNA di *gdhA* nei differenti ceppi sono comparati con quello di MC58 Ω *gdhR1*/*pACgdhR* cresciuto fino a 1.0 OD_{550nm} assunto arbitrariamente pari al 100%.

Legame dell'attivatore trascrizionale GdhR al promotore di *gdhA* ed

identificazione della molecola effettrice di GdhR

I risultati degli esperimenti di inattivazione genica di *gdhR*, suggeriscono che la proteina GdhR può essere un regolatore positivo dell'attività del promotore *gdhA* P2.

Per definire le basi molecolari di tale meccanismo, è stata analizzata la capacità della proteina GdhR, "etichettata" con istidina (His-GdhR), di legare *in vitro* il promotore *gdhA* P2 mediante un saggio di Gel mobility shift (Fig. 24). L'incubazione della proteina His-GdhR con un frammento di DNA lungo 244 bp, marcato all'estremità 5'-terminale, che si estende lungo gli elementi del presunto promotore *gdhA* P2, genera un complesso ritardato (Fig. 24B, corsia 5), titolato specificamente da un eccesso di competitore freddo (Fig. 24B, canali 6 e 7). In contrasto, la proteina His-GdhR non è in grado di legare un frammento di 119 bp contenente l'intera sequenza del promotore *gdhA* P1 (dati non mostrati).

L'analisi della sequenza nucleotidica del putativo promotore *gdhA* P2 ha rivelato la presenza della sequenza palindromica 5'-TGTcaACA-3' conforme alla sequenza consenso generale 5'-(N)yGT(N)xxAC(N)y-3' dei siti operatori dei membri della famiglia FadR (Rigali et al., 2002). Il centro di simmetria di questo putativo sito di legame è localizzato 22 bp a monte dell'esamero a -35 del promotore *gdhA* P2 (Fig. 24B).

Essendo noto che gli acidi organici possono agire come molecole effettrici dei membri della sub-famiglia FadR, è stata saggiata la capacità del piruvato, dell'L-lattato, dell'L-glutammato e del 2-oxoglutarato di influenzare il legame della proteina His-GdhR al DNA. La pre-incubazione di His-GdhR con piruvato, lattato o glutammato 10 mM non altera la formazione del complesso ritardato. In contrasto, la pre-incubazione di His-GdhR con 2-oxoglutarato 10 mM comporta una completa inibizione della formazione del complesso (Fig. 24B, corsie 2-4).

Questo dato indica che il 2-oxoglutarato, un prodotto della reazione catabolica della NADP-GDH ed un intermedio del ciclo TCA, può agire come molecola repressore dell'attività di GdhR.

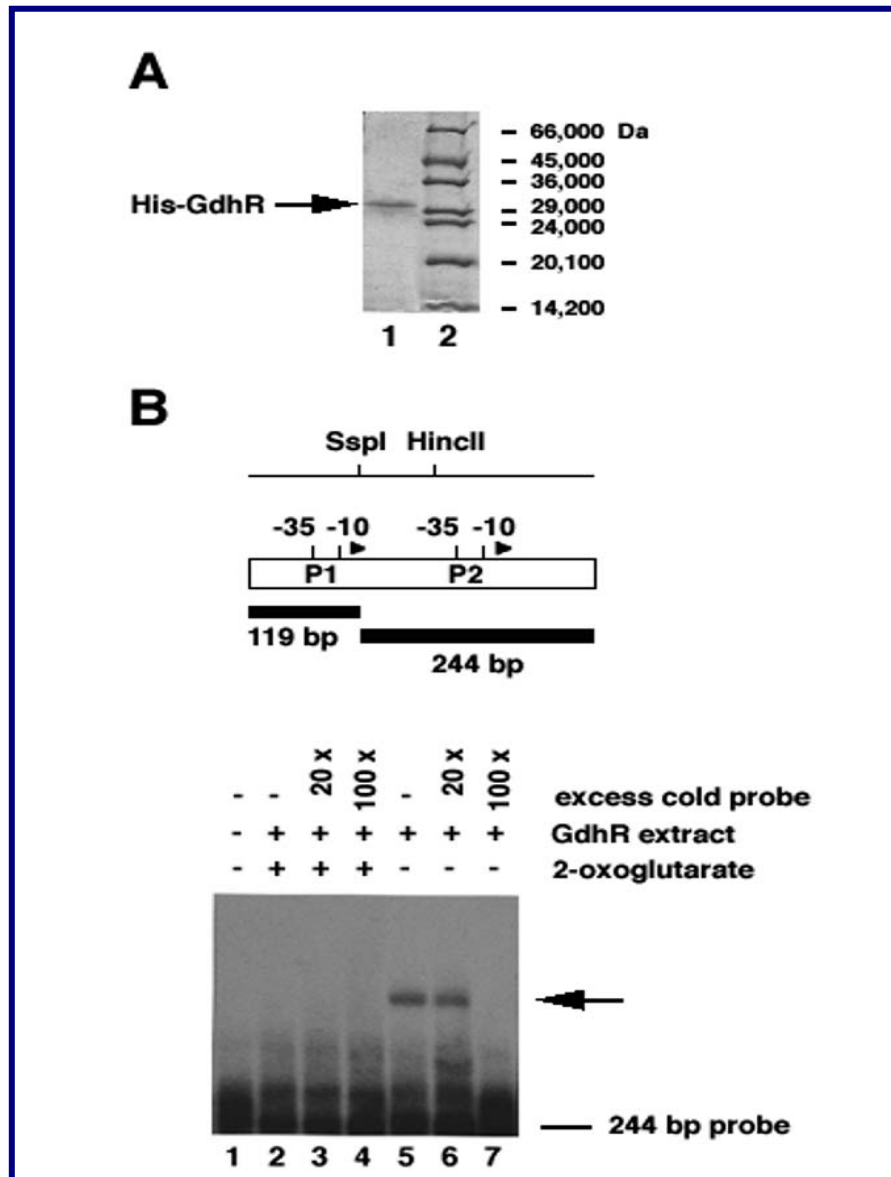


Figura 24. Interazione DNA-proteina tra il promotore *gdhA* P2 e His-GdhR.

A. Analisi mediante SDS-PAGE della proteina purificata His-GdhR. La proteina ricombinante His-GdhR presenta un apparente peso molecolare di 31500 Da, dedotto sulla base della migrazione relativa di una scala di pesi molecolari noti, corsa in parallelo (corsia 2).

B. Analisi di Gel mobility shift. In alto è illustrata la mappa fisica della regione promotore *gdhA* P2-*gdhA* P1. Le *box* nere rappresentano i frammenti di 244 bp e 119 bp utilizzati come sonde negli esperimenti di Gel mobility shift. Il saggio è stato condotto incubando il frammento di 244 bp, marcato all'estremità 5'-terminale, che si estende lungo gli elementi del promotore *gdhA* P2 (corsia 1) in presenza di His-GdhR, ed in assenza (corsie 5-7) e in presenza (corsie 2-4) di 2-oxoglutarato. Il competitore non marcato è stato aggiunto 20 e 100 volte in eccesso rispetto al DNA marcato, dove indicato. La freccia indica il complesso specifico DNA-proteina. La barra in basso indica la sonda non legata.

DISCUSSIONE

L'interesse per la regolazione dell'espressione genica di *gdhA* in isolati clinici di *N. meningitidis* deriva dal fatto che il gene è essenziale per la malattia sistemica in un modello animale di meningite meningococcica (Sun et al., 2000), e dall'evidenza che è differenzialmente espresso in ceppi patogeni, isolati da soggetti malati, ed in ceppi commensali, isolati da individui sani (Fig. 14). E', inoltre, soggetto a regolazione metabolica in differenti condizioni di crescita (Fig. 21; Fig. 22), confermando l'importante ruolo rivestito dai geni metabolici nell'evoluzione di biotipi virulenti in *N. meningitidis* (Sun et al., 2000; Smith et al., 2001; Exley et al., 2005).

I ceppi di meningococco analizzati in tale lavoro sperimentale, possono essere suddivisi in quattro classi, in base alle varianti alleliche della regione intergenica *gdhA-gdhR* (Tabella 1 e Fig. 15). Dei quattro ampliconi identificati, l'allele D, il più lungo, non è stato completamente caratterizzato. L'analisi delle sequenze nucleotidiche suggerisce che l'allele B rappresenti la forma più ancestrale; considerazione che nasce dalla presenza di un singolo dinucleotide TA a valle del terminatore Rho-indipendente bi-direzionale di *gdhA*. Il dinucleotide TA risulta duplicato nei ceppi caratterizzati dall'allele A, come risultato di un evento di pseudo-trasposizione promosso dall'elemento *nemis*. La duplicazione del sito *target* TA è una caratteristica comune agli elementi *nemis* (Mazzone et al., 2001). I ceppi appartenenti alle linee ipervirulente ET-37 ed alla linea 3, come pure la maggior parte dei ceppi isolati da soggetti sani, presentano l'allele C, caratterizzato dalla presenza di due piccole ORFs, a funzione sconosciuta, *orf1* e *orf2*, possibile residuo di un elemento trasponibile o di un elemento fago-like. Inoltre, gli stessi ceppi conservano la sequenza *nemis*, che risulta il bersaglio del putativo elemento mobile che porta *orf1* e *orf2*. L'inserzione dell'elemento mobile è, verosimilmente, avvenuta nella sequenza TATA fiancheggiante l'estremità sinistra dell'elemento *nemis* (Fig. 16).

I saggi di Primer extension e l'analisi strutturale della regione 5' non codificante hanno evidenziato la presenza di due promotori per *gdhA* (Fig. 18A; 18B), *gdhA* P1 e *gdhA* P2. L'inizio della trascrizione dal promotore distale *gdhA* P1 si verifica con una bassa efficienza comparabile in tutti i ceppi analizzati. In contrasto, i trascritti che iniziano dal più forte promotore prossimale, *gdhA* P2, sono evidenziabili solo nei ceppi appartenenti alle linee ipervirulente ET-5 e IV-I ed in altri ceppi caratterizzati dall'allele A e B (Fig. 18; Tabella 1). In tali ceppi *gdhR*, un gene regolatore localizzato a valle di *gdhA* e trascritto in direzione opposta, è espresso in modo costitutivo (Fig. 19) suggerendo che la proteina GdhR possa essere un regolatore positivo dell'espressione di *gdhA*. La trascrizione di *gdhR* è, probabilmente, promossa da un elemento *nemis* che mappa a monte del gene e termina a livello del terminatore Rho-indipendente bi-direzionale, localizzato nella regione intercistronica *gdhA-gdhR* nei ceppi che portano l'allele B (ET-5). Nei ceppi con l'allele di tipo A (IV-I) una *nemis* addizionale è localizzata tra *gdhR* ed il terminatore trascrizionale, tale elemento, comunque, non influenza l'espressione di *gdhR* (Fig. 19).

Nei ceppi appartenenti alle linee ipervirulente ET-37 e linea III, e in gran parte dei ceppi isolati da soggetti sani, portanti l'allele C e D, il gene *gdhR* non è espresso o i livelli di espressione risultano estremamente bassi (Fig. 19); tale meccanismo deve essere, in parte, ancora chiarito ma si ritiene che risulti da una instabilità dell'mRNA di *gdhR* in questi ceppi. L'assenza di una struttura terminatore Rho-indipendente, immediatamente a valle della regione codificante di *gdhR* causa, infatti, il proseguimento della trascrizione nella regione di DNA *orf1-orf2* sul filamento complementare non tradotto.

L'analisi *in silico*, effettuata utilizzando un *software* per l'identificazione di possibili terminatori della trascrizione Rho-dipendenti (TTE) caratterizzati da un elevato rapporto G/C e da una debole struttura secondaria a livello dell'RNA (Alifano et al., 1991), ha rivelato tre putativi elementi TTE, nel filamento antisenso del DNA *orf1-orf2* (TTE1-TTE3, Fig. 16) che presentano tali requisiti (rapporto G/C: TTE1, 7.7:1; TTE2, 3.7:1; TTE3, 2.1:1). La

trascrizione della regione di DNA *orf1-orf2* è, dunque, sottoposta a terminazione Rho-dipendente; i trascritti *gdhR* terminati da Rho, non essendo protetti da RNA con struttura a forcina all'estremità 3' potrebbero essere altamente suscettibili a degradazione da parte delle 3'-esoribonucleasi (Alifano et al., 1994). Ciò giustificerebbe l'effetto in *cis* della regione *orf1-orf2* su *gdhR* e, quindi, sull'espressione di *gdhA*.

L'implicazione di GdhR nella regolazione di *gdhA* è direttamente dimostrata dal *knock-out* del gene (Fig. 20). L'inattivazione inserzionale di *gdhR* nel ceppo MC58 (allele B) comporta una notevole diminuzione dell'espressione di *gdhA* e la completa perdita della sua regolazione in dipendenza della fase di crescita e della sorgente di carbonio (Fig. 21; Fig. 22). In MC58, infatti, i livelli di mRNA di *gdhA* aumentano notevolmente durante la tarda fase di crescita logaritmica in terreno complesso GC (Fig. 21; Fig. 22A); inoltre, nel mezzo chimicamente definito, MCDA, l'espressione di *gdhA* è circa tre volte più alta in presenza di glucosio che in presenza di lattato come sorgente di carbonio (energia) (Fig. 22B; 22C), coerentemente con la precedente evidenza che l'attività della NADP-GDH è incrementata quando il glucosio è addizionato ad un mezzo chimicamente definito (Holten e Jysum, 1973). Sia la regolazione dipendente dalla fase di crescita, che la regolazione dipendente dalla fonte di carbonio sono perse in seguito alla inattivazione di *gdhR*.

I risultati del test di complementazione nel mutante *gdhR*-difettivo, confermano il ruolo regolatore di GdhR sulla trascrizione di *gdhA*, escludendo eventuali artefatti causati dalla perdita di elementi *cis*-agenti (Fig. 23).

GdhR appartiene alla subfamiglia FadR della famiglia GntR dei regolatori *helix-turn-helix* batterici. Tale famiglia include proteine che presentano un simile dominio di legame al DNA N-terminale (D-b), ma differiscono nel dominio di legame dell'effettore e nel dominio di oligomerizzazione C-terminali (E-b/O). La maggior parte delle proteine FadR-like sono implicate nella regolazione di substrati ossidati correlati al metabolismo degli aminoacidi o che si trovano "all'incrocio" di diversi *pathway* metabolici come quello dell'aspartato (AsnR),

del piruvato (PdhR), del glicolato (GlcC), del galattonato (DgoR), del lattato (LldR), del malonato (MatR), o del gluconato (GntR) (Rigali et al., 2002). I regolatori *FadR-like* dimerizzati legano sequenze di DNA a doppia simmetria in cui ciascun monomero riconosce metà sito. Gli acidi organici agiscono come molecole effettrici specifiche che influenzano l'oligomerizzazione tra le subunità regolatorie e/o i cambiamenti conformazionali che permettono la corretta disposizione del motivo *helix-turn-helix* e la conseguente capacità legante della proteina.

I risultati degli esperimenti di DNA Gel mobility shift dimostrano che la proteina His-GdhR si lega alle sequenze di *gdhA* P2 (Fig. 24). Il presunto sito operatore, che consiste di una sequenza palindromica 5'-TGTcaACA-3', è localizzato due giri di elica a monte dell'esamero a -35 di *gdhA* P2. I nostri dati supportano il modello secondo cui GdhR è una proteina di regolazione positiva dell'attività di *gdhA* P2. Esperimenti di Gel mobility shift dimostrano, anche, che il legame di GdhR al DNA è negativamente modulato da una molecola effettrice, il 2-oxoglutarato, un prodotto della reazione catabolica della NADP-GDH, ed un intermedio del ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) (Fig. 24B).

Il ruolo del 2-oxoglutarato come molecola effettrice di GdhR, giustifica la regolazione trascrizionale di *gdhA* da parte delle sorgenti di carbonio (glucosio o lattato), in un mezzo chimicamente definito (Fig. 22B; 22C). E' noto, infatti, che le sorgenti di carbonio influenzano l'attività del ciclo TCA e, quindi, il *pool* intracellulare di 2-oxoglutarato nelle *Neisseriae* patogene.

I meningococchi, batteri dal ristretto spettro d'ospite, sono capaci di utilizzare efficientemente solo pochi composti come sorgente di energia: lattato, piruvato, glucosio e maltosio. Il metabolismo del lattato si realizza mediante almeno tre enzimi lattico deidrogenasi (LDH). I più importanti sono le due LDH, FAD-dipendenti, associate alla membrana citoplasmatica ed implicate nel trasporto degli elettroni. La terza LDH, NAD-dipendente, è una proteina citoplasmatica solubile (Erwin e Gotschlich, 1993; Smith et al 2001). Il lattato fornisce

energia per la crescita agendo da substrato per il trasporto degli elettroni quando esso è ossidato a piruvato; il piruvato, poi, genera acetil-CoA, precursore della sintesi degli acidi grassi, costituente e prodotto del ciclo TCA. Energia addizionale è dunque generata attraverso la produzione di NADH dal ciclo TCA: pienamente funzionale in queste condizioni di crescita (Jyssum, 1960; Holten, 1976; Smith et al., 2001). Recenti dati di letteratura indicano, inoltre, che il lattato risulta una importante fonte di energia per il batterio durante la colonizzazione ed è necessario per la sua crescita nel tessuto nasofaringeo (Exley et al., 2005).

In contrasto, il glucosio è metabolizzato largamente mediante la via di Entner-Doudoroff che genera quantità relativamente basse di energia, con un piccolo contributo dalla via dei pentoso-fosfati (Holten, 1974). A valori di pH neutro, il catabolismo del glucosio risulta nell'accumulo di acetato, il quale non è ulteriormente catabolizzato finché il glucosio non è depleto o diventa limitante per la crescita. La crescita su glucosio, infatti, riduce marcatamente i livelli degli enzimi del ciclo TCA nei gonococchi (Hebeler e Morse, 1976; Morse et Hebeler, 1978).

Come conseguenza, il *pool* intracellulare dell'intermedio del TCA, il 2-oxoglutarato, dipende dalla sorgente di carbonio (energia), e nelle nostre condizioni sperimentali, esso risulta verosimilmente più basso nei meningococchi cresciuti in MCDA-glucosio che in MCDA-lattato. Infatti, i livelli di mRNA di *gdhA* sono più alti quando il glucosio viene usato nel mezzo invece del lattato (Fig. 22B; 22C). La variazione nel *pool* intracellulare del 2-oxoglutarato potrebbe essere responsabile dell'induzione di *gdhA* durante la fase logaritmica tardiva nei meningococchi cresciuti in un terreno ricco (Fig. 21). Complessivamente questi risultati suggeriscono che, in disaccordo con deduzioni precedenti (Holten et Jyssum, 1973), il ruolo della NADP-GDH meningococcica possa essere catabolico per supportare il ciclo TCA rifornendo l'intermedio 2-oxoglutarato quando il glutammato è disponibile nell'ambiente; questa attività potrebbe risultare in una stimolazione metabolica, soprattutto quando il glucosio prevale sul lattato come sorgente di carbonio (energia). Infatti, il *knock-out* di *gdhR*,

che regola positivamente *gdhA*, risulta in un difetto di crescita che è molto più severo in MCDA-glucosio che in MCDA-lattato.

Il ruolo della NADP-GDH ed i meccanismi regolatori in questione possono avere ampie implicazioni poiché il glucosio, il lattato ed il glutammato sono presenti in svariati rapporti nei microambienti rilevanti per l'infezione meningococcica (Smith et al., 2001). Per esempio, il glucosio è la sorgente predominante di carbonio nel sangue (rapporto molare glucosio/lattato, circa 3:1), come pure nel liquido cerebrospinale (rapporto molare glucosio/lattato circa 2.4:1 in soggetti sani). In contrasto, il lattato è la maggiore sorgente di carbonio nella saliva (rapporto glucosio/lattato circa 1:10 in soggetti sani) (Lentner, 1981; 1984), e negli ambienti mucosali colonizzati da batteri lattici come il nasofaringe.

Dati precisi sulle concentrazioni del glucosio e del lattato nell'ambiente intracellulare dell'ospite sono difficili da ottenere *in vivo*. Le evidenze disponibili suggeriscono che il lattato ed il piruvato tendono ad essere usati come principali sorgenti di carbonio all'interno delle cellule fagocitiche (Smith et al., 2001; Williams et al 1998).

La potenzialità di numerosi ceppi di esprimere elevati livelli della NADP-GDH potrebbe, quindi, risultare in un vantaggio di crescita nei siti dell'ospite dove il glucosio prevale sul lattato (o piruvato), ed il glutammato è presente come sorgente di azoto (e carbonio), come nel sangue e nel fluido cerebrospinale, e spiegherebbe la presenza di elevati livelli di espressione di *gdhA* nelle linee ipervirulente, quali ET-5 e IV-I, e l'incapacità dei mutanti di *gdhA* di stabilire un'infezione sistemica in ratti neonati inoculati intraperitonealmente, dimostrando un coinvolgimento di *gdhA* quale intermediario tra metabolismo e patogenicità nei meningococchi.

BIBLIOGRAFIA

- Abrahams, L.G., Abratt, V.R.** 1998. The NADH-dependent glutamate dehydrogenase enzyme of *Bacteroides fragilis* Bfl is induced by peptides in the growth medium. *Microbiology* **144**:1659-1667.
- Achtman, M.** 1995. Epidemic spread and antigenic variability of *Neisseria meningitidis*. *Trends Microbiol.* **3**: 186-192.
- Alexander, H.L., Richardson, A.R., Stojiljkovic, I.** 2004. Natural transformation and phase variation modulation in *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* **52** (3): 771-783.
- Alifano, P., Rivellini, F., Limauro, D., Bruni, C.B., Carlomagno, M.S.** 1991. A consensus motif common to all Rho-dependent prokaryotic transcription terminators. *Cell* **64**: 553-563.
- Alifano, P., Bruni, C.B., Carlomagno, M.S.** 1994. Control of mRNA processing and decay in prokaryotes. *Genetica* **94**: 157-171.
- Atkinson, R.M., Kamberov, E. S., Weiss, R.L., Ninfa, A.J.** 1994. Reversible uridylylation of *E. Coli* PII signal transduction protein regulates its ability to stimulate the dephosphorylation of the transcription factor nitrogen regulator I (NRI or NtrC). *J. Biol. Chem.* **269**: 28288-28293.
- Ayala, P., Lin, L., Hopper, S., Fukuda, M., So, M.** 1998. Infection of epithelial cells by pathogenic *Neisseriae* reduces the levels of multiple lysosomal constituents. *Infect Immun.* **66**: 5501-5507.
- Ayala, P., Vasquez, B., Clary, S., Tainer, J.A., Rodland, K., So, M.** 2001. The pilus-induced Ca²⁺ flux triggers lysosome exocytosis and increases the amount of Lamp1 accessible to *Neisseria* IgA1 protease. *Cellular Microbiology* **3**: 265-275.
- Ayala, P., Vasquez, B., Wetzler, L., So, M.** 2002. *Neisseria gonorrhoeae* porin P1. B induces exocytosis and a redistribution of Lamp1 to the plasma membrane. *Infect. Immun.* **70**: 5965-5971.
- Becerill, B., Valle, F., Merino, E., Riba L., Bolivar, F.** 1985. Repetitive extragenic palindromic (REP) sequences in the *Escherichia coli* *gdhA* gene. *Gene*. **37**: 53-62.
- Black, C.G., Fyfe, J.A.M., Davies, J.K.** 1995. A promoter associated with the neisserial repeat can be used to transcribe the *uvrB* gene from *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* **177**: 1952-1958.
- Bormann, E.R., Eikmanns, B.J., Sahm, H.** 1992. Molecular analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *gdh* gene encoding glutamate dehydrogenase. *Mol. Microbiol.* **6**: 317-326.
- Britigan, B.E., Klapper, D., Svendsen, T., Cohen, M.S.** 1988. Phagocyte-derived lactate stimulates oxygen consumption by *Neisseria gonorrhoeae*. An unrecognized aspect of the oxygen metabolism of phagocytosis. *J. Clin Invest.* **81**:318-324.

- Broome, C.** 1986. The carrier state: *Neisseria meningitidis*. J. Antimicrob. Chemother. **18**: 25-34.
- Bucci, C., Lavitola, A., Salvatore, P., Del Giudice, L., Massardo, D.R., Bruni, C.B., Alifano, P.** 1999. Hypermutation in pathogenic bacteria: frequent phase variation in meningococci is a phenotypic trait of a specialized mutator biotype. Mol. Cell **3**: 435-445.
- Camacho, L.R., Ensergueix, D., Perez, E., Gicquel, B., Guilhot, C.** 1999 Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. Molecular Microbiology **34**: 257- 267.
- Camarena, L., Poggio, S., Garcia, N., Osorio, A.** 1998. Transcriptional repression of *gdhA* in *Escherichia coli* is mediated by the Nac protein. FEMS Microbiology Letters. **167**: 51-56.
- Cantalupo, G., Bucci, C., Salvatore, P., Pagliarulo, C., Roberti, V., Lavitola, A.** 2001. Evolution and function of the neisserial *dam*-replacing gene. FEBS Lett. **495**: 178-183.
- Caugant, D.A.** 1998. Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. APMIS **106**: 505-525.
- Chiang, S.L., Mekalanos, J.J.** 1998. Use of signature-tagged transposon mutagenesis to identify *Vibrio cholerae* genes critical for colonization. Mol. Microbiol. **27**: 797-805.
- Cohen, M.S., Cooney, M.H.** 1984. A bacterial respiratory burst: stimulation of the metabolism of *Neisseria gonorrhoeae* by human serum. J. Infect. Dis. **150**: 49-56.
- De Gregorio, E., Abrescia, C., Carlomagno, M.S., Di Nocera, P.P.** 2002. The abundant class of *nemis* repeats provides RNA substrates for ribonuclease III in *Neisseriae*. Biochim. Biophys. Acta **1576**: 39-44.
- De Vries, F.P., Cole, R., Dankert, J., Frosch, M., van Putten, J.P.** 1998. *Neisseria meningitidis* producing the Opc adhesin binds epithelial cell proteoglycan receptors. Mol. Microbiol. **27**: 1203-1212.
- Dixon, R.** 1984 Tandem promoters determine regulation of the *Klesiella pneumoniae* glutamine syntetase (*glnA*) gene. Nucleic Acids Research. **12**: 146-156.
- Dunn, K.L., Farrant, J.L., Langfor, P.R., Kroll, J.S.** 2003. Bacterial [Cu,Zn]-cofactored superoxide dismutase protects opsonized, encapsulated *Neisseria meningitidis* from phagocytosis by human monocytes/macrophages. Infect. Immun. **71**: 1604-1607.
- Elmansi, E. M. T., Hoims, W. H.** 1989. Control of carbon flux to acetate excretion during growth of *Escherichia coli* in batch and continuous cultures. J. Gen. Microbiol. **135**: 2875-2883.
- Erwin, A.L., Gotschlich, E.C.** 1993. Oxidation of D-lactate and L-lactate by *Neisseria meningitidis*: purification and cloning of meningococcal D-lactate dehydrogenase. J. Bacteriol. **175**: 6382-6391.

- Erwin, L.A., Gotschlich, E.C.** 1996. Cloning of a *Neisseria meningitidis* gene for L-lactate dehydrogenase (L-LDH): evidence for a second meningococcal L-LDH with different regulation. *J. Bacteriol.* **178**: 4807-4813.
- Exley, R.M., Goodwin, L., Mowe, E., Shaw, J., Smith, H., Read, R.C., Tang, C.M.** 2005. *Neisseria meningitidis* lactate permease is required for nasopharyngeal colonization. *Infect Immun.* **73** (9): 5762-5766.
- Feavers, I.M., Heath, A.B., Bygraves, J.A., Maiden, M.C.J.** 1992. Role of horizontal genetic exchange in antigenic variation of the class 1 outer membrane protein of *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* **6**: 489-495.
- Fischer, R.S., Martin, G.C., Rao, P., Jensen, R.A.** 1994. *Neisseria gonorrhoeae* possesses two nicotinamide adenine dinucleotide-independent lactate dehydrogenases. *FEMS Microbiol.* **115**: 39-44.
- Frash, C. E., Zollinger W. D., and Poolman J. T.** 1985. Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes. *Rev. Infect. Dis.* **7**: 504-510
- Frosch, M., Schultz, E., Glenn-Calvo, E., Meyer, T.F.** 1990. Generation of capsule-deficient *Neisseria meningitidis* strains by homologous recombination. *Mol. Microbiol.* **4**:1215-1218.
- Fukuda, M.** 1991. Lysosomal glycoproteins: structure, biosynthesis and intracellular trafficking. *J. Biol. Chem.* **266**: 21327-21330.
- Gao, L., Parsons, N.J., Curry, A., Cole, J.A., Smith, H.** 1998. Lactate causes changes in gonococci including increased lipopolysaccharide synthesis during short-term incubation in media containing glucose. *FEMS Microbiology Letters* **169**: 309-316.
- Genco, C.A., Desai, P.J.** 1996. Iron acquisition in the pathogenic *Neisseria*. *Trends Microb.* **4** (5): 179-184.
- Hadi, H.A., Wooldridge, K.G., Robinson, K., Alà Aldeen, D.A.** 2001. Identification and characterization of App: an immunogenic autotransporter protein of *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* **41**: 611-23.
- Halter, R., Pohler, J., Meyer, T.F.** 1989. Mosaic-like organization of IgA protease genes in *Neisseria gonorrhoeae* generated by horizontal genetic exchange *in vivo*. *EMBO J.* **8**: 2737-2744.
- Halter, R., Pohler, J., Meyer, T.F.** 1994. IgA protease of *Neisseria meningitidis*: isolation and characterization of the gene and its extracellular product. *EMBO J.* **3**: 1595-1601.
- Hammerschmidt, S., Birkholz, C., Zahringer, U., Robertson, B.D., van Putten, J., Ebeling, O., Frosch, M.** 1994. Contribution of genes from the capsule gene complex (*cps*) to lipooligosaccharide biosynthesis and serum resistance in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol.* **11**: 885-896.
- Hammerschmidt, S., Muller, A., Silliman, H., Muhlenhoff, M., Borrow, R., Fox, R., van Putten, J., Zollinger, W.D., Gerardy-Schahn, R., Frosch, M.** 1996. Capsule phase

variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (SiaD): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease. *Mol. Microbiol.* **20**: 1211-1220.

Hassett, D.J., Cohen, M.S. 1989. Bacterial adaptation to oxidative stress: implications for pathogenesis and interaction with phagocytic cells. *FASEB J.* **3**: 2574-2582.

Hebeler, B.H., Morse, S.A. 1976. Physiology and metabolism of pathogenic neisseria: tricarboxylic acid cycle activity in *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* **128**: 192-201.

Helling, R.B. 1994. Why does *Escherichia coli* have two primary pathways for synthesis of glutamate? *J. Bacteriol.* **176**: 4664-4668.

Hensel, M., Shea, J.E., Gleeson, C., Jones, M.D., Dalton, E., Holden, D.W. 1995. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science.* **269**: 400-403.

Holten, E. 1973. Glutamate dehydrogenases in genus *Neisseria*. *Acta Path. Microbiol. Scand.* **81**: 49-58.

Holten, E., Jyssum, K. 1973. Glutamate dehydrogenases in *Neisseria meningitidis*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B Microbiol. Immunol.* **81**: 43-48.

Holten, E. 1974. 6-Phosphogluconate dehydrogenase and enzymes of the Entner-Doudoroff pathway in *Neisseria*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B Microbiol. Immunol.* **82**: 207-213.

Holten, E. 1976. Pyridine nucleotide independent oxidation of L-malate in genus *Neisseria*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **84**: 17-21.

Hook, E.W., Holmes, K.K. 1985. Gonococcal infections. *Ann Intern Med.* **102**: 229-243.

Householder, T.C., Belli, W.A., Lisseden, S., Cole, J.A., Clark, V.L. 1999. Cis- and trans-acting elements involved in regulation of *omiA*, the gene encoding the major anaerobically induced outer membrane protein in *Neisseria gonorrhoeae*. *J. bacteriol.* **181**: 541-551

Janes, B.K., Bender, R.A. 1998. Alanine catabolism in *Klebsiella aerogenes*: molecular characterization of the *dadAB* operon and its regulation by nitrogen assimilation control protein. *J. Bacteriol.* **180**: 563-570.

Jarvis, G.A. 1995. Recognition and control of neisserial infection by antibody and complement. *Trends Microbiol.* **3**: 198-201.

Jiang, P., Peliska, J.A., Ninfa, A.J. 1998. Recostitution of the signal-transduction bicyclic cascade responsible for the regulation of *Ntr* gene transcription in *Escherichia coli*. *Biochemistry.* **37**: 12795-12801.

Jyssum, K. 1960. Intermediate reactions of the tricarboxylic acid cycle in meningococci. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B Microbiol. Immunol.* **48**: 121-132.

- Kallstrom, H., Liszewski, M.K., Atkinson, J.P., Jonsson, A.B.** 1997. Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *Neisseria*. *Mol. Microbiol.* **25**: 639-47.
- Kallstrom, H., Islam, M.S., Berggren, P.O., Jonsson, A.B.** 1998. Cell signaling by the type IV pili of pathogenic *Neisseria*. *J. Biol. Chem.* **273**: 21777-21782.
- Kamberov, S.E., Atkinson, M.R., Ninfa, A.J.** 1995. The *Escherichia coli* PII signal transduction protein is activated upon binding 2-Ketoglutarate and ATP. *J. Biol. Chem.* **270**: 17797- 17807.
- Koomey, M., Gotschlich, E. C., Robbins, K., Bergstrom, S., Swanson, J.** 1987. Effects of *recA* mutations on pilus antigenic variation and phase transitions in *Neisseria gonorrhoeae*. *Genetics* **117**:391-398.
- Kornfeld, S., Mellman, I.** 1989. The biogenesis of lysosomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**: 483-525
- Laskos, L., Dillard, J.P., Seifert, H.S., Fyfe, J.A., Davies, J.K.** 1998. The pathogenic *neisseriae* contain an inactive *rpoN* gene and not utilize the *pilE* sigma54 promoter. *Gene.* **208**: 95-102.
- Lavitola, A., Bucci, C., Salvatore, P., Maresca, G., Bruni, C.B., Alifano, P.** 1999. Intracistronic trascription termination in polysialyltransferase gene (*siaD*) affects phase variation in *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* **33**: 119-127.
- LeClerc, J.E., Li, B., Payne, W.L., Cerula, T.A.** 1996. High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. *Science.* **274**:1208-1211.
- Leighton, P.M., Kelly, D.J., Williamson, P.M., Shaw, J.G.** 2001. An NMR and enzyme study of the carbon metabolism of *Neisseria meningitidis*. *Microbiology.* **147**:1473- 1482.
- Lentner, C.** 1981. Geigy scientific tables, vol. 1. Units of measurements, body fluids, composition of the body, nutrition. Basel: Ciba Geigy Ltd.
- Lentner, C.** 1984. Geigy scientific tables, vol. 3. Physical chemistry, composition of the blood, hematology, somatometric data. Basel: Ciba Geigy Ltd.
- Lin, L., Larson, P., Mulks, J., Fukuda, M., Carlson, S.R., Enns, M.** 1997. The *Neisseria* type 2 IgA1 protease cleaves LAMP1 and promotes survival of bacteria within epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **24**: 1083-1094.
- Lisseden, S., Mohan, S., Overton, T., Regan, T., Crooke, H., Cardinale, J.A., Householder, T.C., Adams, P., O'Conner, C.D., Clark, V.L., Smith, H., Cole, J.A.** 2000. Identification of transcription activators that regulate gonococcal adaption from aerobic to anaerobic or oxigen-limited growth. *Mol. Microbiol.* **37**: 839-855
- Liu, J., Magasonik, B.** 1995. Activation of the dephosphorylation of nitrogen regulator I-phosphate of *Escherichia coli*. *J. Bacterial.* **177**: 926-931.

- Lu, C.D., Abdelal, A.T.** 2001. The *gdhB* gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes an arginine-inducible NAD⁺-dependent glutamate dehydrogenase which is subject to allosteric regulation. *J. Bacteriol.* **183**: 490-499.
- Macaluso, A., Best, E.A., Bender, R.A.** 1990. Role of gene *nac* product on the nitrogen regulation of some Ntr-regulated of *Klebsiella aerogenes*. *J. Bacteriol.* **172**: 7249-7255.
- Maiden, M.C.J., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M., Spratt, B.G.** 1998. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**(6): 3140–3145.
- Mazzone, M., De Gregorio, E., Lavitola, A., Pagliarulo C., Alifano, P., Di Nocera, P.P.** 2001. Whole-genome organization and functional properties of miniature DNA insertion sequences conserved in pathogenic *Neisseriae*. *Gene.* **278**: 211-222.
- McCleary, W.R., Stock, J.B.** 1994. Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators. *J Biol Chem.* **269**: 31567-31572.
- McPherson, J.M., Wootton, J.C.** 1983. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* *gdhA* gene. *Nucleic Acids Research.* **11**: 5257-66.
- Mecsas, J.** 2002. Use of signature-tagged mutagenesis in pathogenesis studies. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**: 33-37.
- Mei, J.M., Nourbakhsh, F., Ford, C.W., Holden, D.W.** 1997. Identification of *Staphylococcus aureus* virulence genes in a murine model of bacteria using signature-tagged mutagenesis. *Mol. Microbiol.* **26**: 399-407.
- Meyer, T.F., Gibbs, C.P., Haas, R.** 1990. Variation and control of protein expression in *Neisseriae*. *An. Rev. Microbiol.* **44**: 451-477
- Meyer, T.F., Phlner, J., van Putten, J.P.** 1994. Biology of the pathogenic *Neisseriae*. *Microbiol. Immunol.* **192**: 283-317
- Merino, E., Becerril, B., Valle, F., Bolivar, F.** 1987. Deletion of repetitive extragenic palindromic (REP) sequence downstream from the structural gene of *Escherichia coli* glutamate dehydrogenase affects the stability of its mRNA. *Gene.* **58**: 305-309.
- Merrik, M.J., Edwards, R.A.** 1995. Nitrogen control in Bacteria. *Microbiological Reviews.* **59**: 604-622.
- Merz, A.J., So, M.** 2000. Interactions of pathogenic *Neisseriae* with epithelial cell membranes. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **16**: 423-457.
- Miller, E.S., Brenchley, J.E.** 1984. Cloning and characterization of *gdhA*, the structural gene for glutamate dehydrogenase of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **157**:171-178.
- Miller, E.** 2002. Planning, registration, and implementation of an immunization campaign against meningococcal serogroup C disease in the UK: a success story. *Vaccine* **20**: 558-567.

- Minambres, B., Olivera E.R., Jensen, R.A., Luengo, J.M.** 2000. A new class of glutamate dehydrogenases (GDH). *J. Biol. Chem.* **275**: 39529-39542.
- Morse, S.A., Hebeler, B.H.** 1978. Effect of pH on the growth and glucose metabolism of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect. Immun.* **21**: 87-95.
- Mountain, A., McPherson, M.J., Baron, A.J., Wootton, J.C.** 1985. The *Klebsiella aerogenes* glutamate dehydrogenase (*gdhA*) gene: cloning, high-level expression and hybrid enzyme formation in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **199**: 141-145.
- Moxon, E.R., Rainey, P.B., Nowak, M.A., Lenski, R.E.** 1994. Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. *Curr. Biol.* **4**: 24-33
- Muse, M.B., Bender, R.A.** 1998. The *nac* (nitrogen assimilation control) gene *E. coli*. *J. Bacteriol.* **180**: 1166-1173.
- Nassif, X., Beretti, J.L., Lowy, J., Stenberg, P., O'Gaora, P., Pfeifer, J., Normark, S., So, M.** 1994. Roles of pilin and PilC in adhesion of *Neisseria meningitidis* to Human epithelial and endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 3769-3773
- Nassif, X.** 1999. Interaction mechanisms of encapsulated meningococci with eucaryotic cells: what does this tell us about the crossing of blood-brain barrier by *Neisseria meningitidis*? *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 71-77.
- Nei, M.** 1975. Molecular polymorphism and evolution. North-Holland Publishing Co., Amsterdam, The Netherlands.
- Ninfa, J.A., Bennet, R.L.** 1991. Identification of the site of autophosphorylation of the bacterial protein Kinase/phosphatase NRII. *J. Biol. Chem.* **266**: 6888-6893.
- Parkill, J., Achtman, M., Jones, K.D., Churcher, C., Klee, S.R.** 2000. Complete DNA sequence of a serogroup A strain of *Neisseriae meningitidis* Z2491. *Nature.* **404**: 502-506.
- Pavliak, V., Briosson, J.R., Michon, F., Uhrin, D., Jennings, H.J.** 1993. Structure of the sialylated L3 lipopolysaccharide of *Neisseria meningitidis*. *J Biol Chem.* **268**: 14146-14152.
- Polissi, A., Pontiggia, A., Feger, G., Altieri, M., Mottl, H., Ferrari, L., Simon, D.** 1998. Large-scale identification of virulence genes from *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **66**: 5620-5629.
- Rahman, M., Kallstrom, H., Normark, S., Jonsson, A.B.** 1997. PilC of pathogenic *Neisseria* is associated with the bacterial cell surface. *Mol Microbiol.* **25**: 11-25.
- Read, R.C., Zimmerli, S., Broaddus, V. C., Sanan, D. A., Stephens, D., Ernst, J.** 1996. The (α 2-8)-linked polysialic acid capsule of group B *Neisseria meningitidis* modifies multiple steps during interaction with human macrophages. *Infect. Immun.* Aug. 3210-3217.
- Reitzer, L., Schneider, B.L.** 2001. Metabolic context and possible physiological themes of σ^{54} -dependent genes in *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **65**: 422-444.

Riba, L., Becerril, B., Servin-Gonzalez, L., Valle, F., Bolivar, F. 1988. Identification of a functional promoter for *Escherichia coli* *gdhA* gene and its regulation. *Gene*. **71**: 233-246.

Richardson, A.R., Stojiljkovic. I. 2001. Mismatch repair and the regulation of phase variation in *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* **40**: 645-655

Rigali S., Derouaux, A., Gianotta, F., Dusart, J. 2002. Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies. *J. Biol. Chem.* **277**: 12507-12515.

Robertson, B.D., Meyer, T.F. 1992. Genetic variation in pathogenic bacteria. *Trends Genet.* **8**: 422-427

Rudel, T., Van Putten, J.P., Gibbs, C.P., Haas, R., Meyer., T.F. 1992. Interaction of two proteins (Pile and PilC) required for pilus-mediated adherence of *Neisseria gonorrhoeae* to human epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **6**: 3439-3450.

Sakamoto, N., Kotre, A.M., Savageau, M.A. 1975. Glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*: purification and properties. *J. Bacteriol.* **124**: 775-783.

Salvatore, P., Cantalupo, G., Pagliarulo, C., Tredici, M., Lavitola, A., Bucci, C., 2000. A new vector for insertion of any DNA fragment into the chromosome of transformable *Neisseria*. *Plasmid* **44**: 275-279.

Salvatore, P., Pagliarulo, C., Colicchio, R., Zecca, P., Cantalupo, G., Tredici, M., Lavitola, A., Bucci, C., Bruni, C. B., Alifano P. 2001. Identification, characterization, and variable expression of a naturally occurring inhibitor protein of IS1106 transposase in clinical isolates of *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* **69**: 7425-7436.

Salvatore, P., Bucci, C., Pagliarulo, C., Tredici, M., Colicchio, R., Cantalupo, G., Bardaro, M., Del Giudice, L., Massardo, R.D., Lavitola, A., Bruni, C.B., Alifano, P. 2002. Phenotypes of a Naturally Defective *recB* Allele in *Neisseria meningitidis* Clinical Isolates. *Infect Immun.* **70**: 4185-4195.

Sambrook, J., e D. W. Russell. 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd edn (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory).

Sanger , F., Nicklen, S., Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **74**: 5463-5466.

Sarkari, J., Pandit, N., Moxon, E.R., Achtman, M. 1994. Variable expression of the Opc outer membrane protein in *Neisseria meningitidis* is caused by size variation of a promoter containing poly-cytidine. *Mol. Microbiol.* **13**: 207-217.

Saunders, N.J., Jeffries, A.C., Peden, J.F., Hood, D., Tettelin, H., Rappuoli, R., Moxon, E.R. 2000. Repeat-associated phase variable genes in the complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* strain MC58. *Mol. Microbiol.* **37**: 207-215.

Scheuerpflug, I., Rudel, T., Ryll, R., Pandit, J., Meyer, T.F. 1999. Roles of PilC and Pile proteins in pilus-mediated adherence of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* to human erythrocytes and endothelial and epithelial cells. *Infect. Immun.* **67**: 834-843

- Schryvers, A.B., Stojilkovic, I.** 1999. Iron acquisition systems in the pathogenic *Neisseria*. *Mol. Microbiol.* **37**: 207-215
- Schwacha, A., Bender, R. A.** 1993. The product of the *nac* (nitrogen assimilation control) gene is sufficient for activation of the *hut* operons and repression of the *gdh* operon. *J. Bacteriol.* **177**: 2116-2124.
- Seifert, H.S.** 1996. Questions about gonococcal pilus phase- and antigenic variation. *Mol. Microbiol.* **21**: 433-440.
- Selander, R.K., Caugant, D.A., Ochman, H., Musser, J.M., Gilmour, M.N., Whittam, T.S.** 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ Microbiol.* **51**:873-884.
- Shea, E.J., Santangelo, J. D., Feldman, R.G.** 2000. Signature-tagged mutagenesis in the identification of virulence genes in pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**: 451-458.
- Smith H.** 1975. Modern diseases and their control. *Infectious. Community Health (Bristol)*. Jan-Feb; **6** (4):235-237.
- Smith, H., Yates, E.A., Cole, J.A., Parsons, N.J.** 2001. Lactate stimulation of gonococcal metabolism in media containing glucose: mechanism, impact on pathogenicity, and wider implications for other pathogens. *Infect. Immun.* **69**: 6565-6572.
- Sneath, P.H.A., e Sokal, R.R.** 1973. Numerical taxonomy. W. H. Freeman & Co., San Francisco, Calif.
- Spellerberg, B., Cundell, D.R., Sandros, J., Pearce, B.J., Idanpaan-heikkila, I., Rosenow, C., Masure, H.R.** 1996. Pyruvate oxidase, as a determinant of virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* **19**: 803-813.
- Stephens, D., McGree, Z.** 1981. Attachment of *Neisseria meningitidis* to human mucosal surface: influence of pili and type of receptor cell. *J. Infect. Dis.* **143**: 525-532
- Stephens, D.S., Whitney, A.M., Rothbard, J., Schoolnik, G.K.** 1985. Pili of *Neisseria meningitidis*. Analysis of structure and investigation of structural and antigenic relationships to gonococcal pili. *J. Exp. Med.* **161**: 1539-1553.
- Sun, Y.H., Bakshi, S., Chalmers, R., e Tang, C.M.** 2000. Functional genomics of *Neisseria meningitidis* pathogenesis. *Nat. Med.* **6**: 1269-1273.
- Tzanakaki, G., Urwin, R., Musilek, M., Kriz, P., Kremastinou, J., Pangalis, A., Blackwell, C.C., Maiden, M.C.J.** 2001. Phenotypic and Genotypic Approaches to Characterization of Isolates of *Neisseria meningitidis* from Patients and Their Close Family Contacts. *J Clin Microbiol.* **39** (4): 1235–1240.
- Van Deuren, M., Brandtzaeg, P., van der Meer, J.W.** 2000. Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**: 144-166

- Virji, M.** 1996. Meningococcal disease: epidemiology and pathogenesis. *Trends Microbiol.* **4**: 466-469.
- Virji, M., Watt, S.M., Barker, S., Makepeace, K., Doyonnas, R.** 1996. The N-domain of the human CD66a adhesion molecule is a target for Opa proteins of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol. Microbiol.* **22**: 929-939.
- Ulmer, J.B., Burke, C.J., Friedman, A., Donnelly, J.J., Liu, M.A.** 1992. Pore formation and mitogenicity in blood cells by class 2 protein of *Neisseria meningitidis*. *J. Biol. Chem.* **267**: 19266-19271.
- van der Ende, A., Hopman, C.T., Zaat, S., Essink, B.B., Berkhout, B., Dankert, J.** 1995. Variable expression of class 1 outer membrane protein in *Neisseria meningitidis* is caused by variation in the spacing between the -10 and -35 regions of the promoter. *J. Bacteriol.* **177**: 2475-2480.
- Van Putten, J.M.P.** 1993. Phase variation of lipopolysaccharide directs interconversion of invasive and immuno-resistant phenotypes of *Neisseria gonorrhoeae*. *EMBO J.* **12**: 4043-4051.
- Zhou, J., Spratt, B. G.** 1992. Sequence diversity within the *argF*, *fbp* and *recA* genes of natural isolates of *Neisseria meningitidis* inter-species recombination within the *argF* gene. *Mol. Microbiol.* **6**: 2135-2146.
- Wainwright, L. A., Frangipane, J. V., Seifert H. S.** 1997. Analysis of protein binding to the *Sma/Cla* DNA repeat in pathogenic *Neisseriae*. *Nucleic Acids Res.* **25**:1362-1368.
- Weel, J.F., van Putten, J.P.** 1991. Fate of the major outer membrane protein P.IA in early and late events of gonococcal infection of epithelial cells. *Res. Microbiol.* **142**: 985-993.
- Weiss, D. S., Batut, J., Klose, J., Kutsus, S.** 1991. The phosphorylated form of the enhancer-binding protein NtrC has an ATPase activity that is essential for activation of transcription. *Cell.* **67**: 155-167.
- Wen, K.K., Giardina, P.C., Blake, M.S., Edwards, J., Apicella, M.A., Rubenstein, P.A.** 2000. Interaction of the gonococcal porin P.IB with G- and F-actin. *Biochemistry* **39**: 8638-8647.
- Williams, J.M., Chen, G.-C., Zhu, L., Rest, R.F.** 1998. Using the yeast two-hybrid system to identify human epithelial cell proteins that bind gonococcal Opa proteins: intracellular gonococci bind pyruvate kinase via their Opa proteins and require host pyruvate for growth. *Mol. Microbiol.* **27**: 171-186.
- Wolfe, A. J., Chang, D.E., Walker, J.D., Seitz-Partridge, J.E., Lange Vidaurri, C.F., Prub, B.M., Henc, M.C., Larkin, J.C., Conway, T.L.** 2003. Evidence that acetyl phosphate function as a global signal during biofilm development. *Mol. Microbiol.* **48**: 2345-2356.
- Yates, E., Gao, L., Woodcock, N., Parson, N., Cole J., Smith, H.** 2000. In a medium containing glucose, lactate carbon is incorporated by gonococci predominantly into fatty acids and glucose carbon incorporation is increased: implications regarding lactate stimulation of metabolism. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**: 627-639.

Yates, E. A., Smith, H. 2003. Lactate carbon does not enter the sugars of lipopolysaccharide when gonococci are grown in a medium containing glucose and lactate: implications *in vivo*. FEMS Microbiol. Lett. **218**: 245-250.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare tutti coloro che nel corso di questi anni di Dottorato di Ricerca mi hanno sostenuto ed arricchito sia professionalmente che umanamente.

In primo luogo, colgo l'occasione per ringraziare il Prof. C. Bruno Bruni, coordinatore del corso di Dottorato di Ricerca in Genetica e Medicina Molecolare, per il sostegno, la disponibilità ed il supporto scientifico che mi ha dato durante tutto il periodo trascorso nei suoi laboratori.

Un ringraziamento particolare è rivolto alla Prof.ssa Paola Salvatore, mio tutor durante gli anni di dottorato, ed al Prof. Pietro Alifano i cui continui consigli ed incoraggiamenti si sono rivelati determinanti per la mia formazione scientifica e crescita professionale, e che rappresentano un insostituibile punto di riferimento.

Ringrazio dal profondo del cuore la Dott.ssa Caterina Pagliarulo per avermi mostrato sempre grande stima ed affetto, e per la preziosissima collaborazione che ha consentito lo sviluppo di questo lavoro.

Un ringraziamento speciale è rivolto alla Prof.ssa Maria Stella Carlomagno per l'aiuto ed i consigli "illuminanti" che sono risultati fondamentali per il perseguire dei miei risultati scientifici.

Infine desidero ringraziare la Dott.ssa Florentia Lamberti e tutti i collaboratori della Prof.ssa Salvatore e dei laboratori del Prof. Bruni per il supporto morale e scientifico e per l'amicizia mostrata nella mia esperienza presso il Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare "L. Califano".